

3 Ergebnisse

Die Komponenten der peroxisomalen Translokationsmaschinerie umfassen neben den weitgehend cytosolischen PTS-Rezeptoren eine Reihe von peripheren und integralen Membranproteinen. Zwei dieser peroxisomalen Membranproteine, Pex14p und Pex13p, sind in der Lage, den Rezeptor für das peroxisomale Targetingsignal 1, Pex5p, zu binden. Für Pex14p und in späteren Arbeiten für Pex13p konnten Interaktionen mit dem PTS2-Rezeptor Pex7p gezeigt werden (Girzalsky *et al.*, 1999). Die Interaktion zwischen Pex13p und Pex5p verläuft über die SH3-Domäne von Pex13p, diese Domäne ist ebenfalls für die Interaktion mit Pex14p verantwortlich, jedoch nicht für jene mit Pex7p. Um nun den Bereich von Pex13p, der tatsächlich für eine Interaktion mit Pex7p erforderlich ist, zu finden, erfolgte im Rahmen dieser Arbeit eine Deletionsanalyse von Pex13p mittels des Hefe Two-Hybrid Systems.

3.1 Anwendung des Two-Hybrid Systems

Das Two-Hybrid System hat sich vielfach als effiziente und sensitive Technik für *in vivo* Nachweise von Protein-Protein-Interaktionen erwiesen und wurde erstmals von Fields und Song als „Interaction Trap“ (Interaktionsfalle) beschrieben (Fields und Song, 1989). Da zahlreiche Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mittels dieser Methode erhalten wurden, soll dieses System kurz vorgestellt werden. Das Two-Hybrid System beruht auf dem Prinzip, dass das Gal4 Protein (Gal4p) aus 2 trennbaren Strukturdomänen besteht (Abb. 3.1). Gal4p ist ein Transkriptionsfaktor aus *S. cerevisiae*, der spezifisch an die Promotoren der Galaktose-induzierbaren Gene, wie zum Beispiel das *GAL1* Gen, bindet. Die DNA bindende Domäne (Gal4p-BD) interagiert mit spezifischen „Upstream-Aktivator-Sequenzen“ (UAS) des *GAL1*-Promotors und ist für die korrekte Positionierung des Transkriptionsfaktors zuständig. Die Aktivierungsdomäne (Gal4p-AD) interagiert mit einem DNA-Polymerase II-Komplex und initiiert damit die Transkription. Die isolierten Domänen interagieren nicht miteinander. Sie müssen für ihre Funktion nicht kovalent verbunden sein und können deshalb mit Proteinen fusioniert werden, deren Interaktion überprüft werden soll. Treten die beiden Gal4p-Domänen durch die Wechselwirkung der fusionierten Proteine in räumlicher Nähe zueinander, initiieren sie die Transkription eines Reportergens, welches unter dem Einfluss des *GAL1*-Promotors steht. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten *S.cerevisiae* Hefestamm fungieren als Reportergene *HIS3* sowie *lacZ*. Die beiden kodierenden Sequenzen für die Gal4p-Domänen liegen in den Vektoren pPC97 (Gal4p-DB) und pPC86 (Gal4p-AD) vor, die zur späteren Selektion das Leucin bzw. Tryptophan Gen enthalten. Nach Kotransformation

beider Plasmide in einen Two-Hybrid Stamm wurden die Doppeltransformanten auf -Leu/-Trp Selektivmedium selektioniert. Nach 3 Tagen erfolgte eine Vereinzlung der Klone und anschließend eine Replikaplattierung auf -Leu/-Trp/-His-Selektivplatten. Bei Interaktion der Proteine sollte nach 1-7 Tagen je nach Interaktionsstärke ein Wachstum auf Histidin-Mangelmedium beobachtet werden. Beim Test auf His-Prototrophie wurde den Platten 1-10 mM 3-Aminotriazol, welches als kompetitiver Inhibitor von *HIS3* fungiert, zugesetzt, um eine stringente Selektion erzielen zu können.

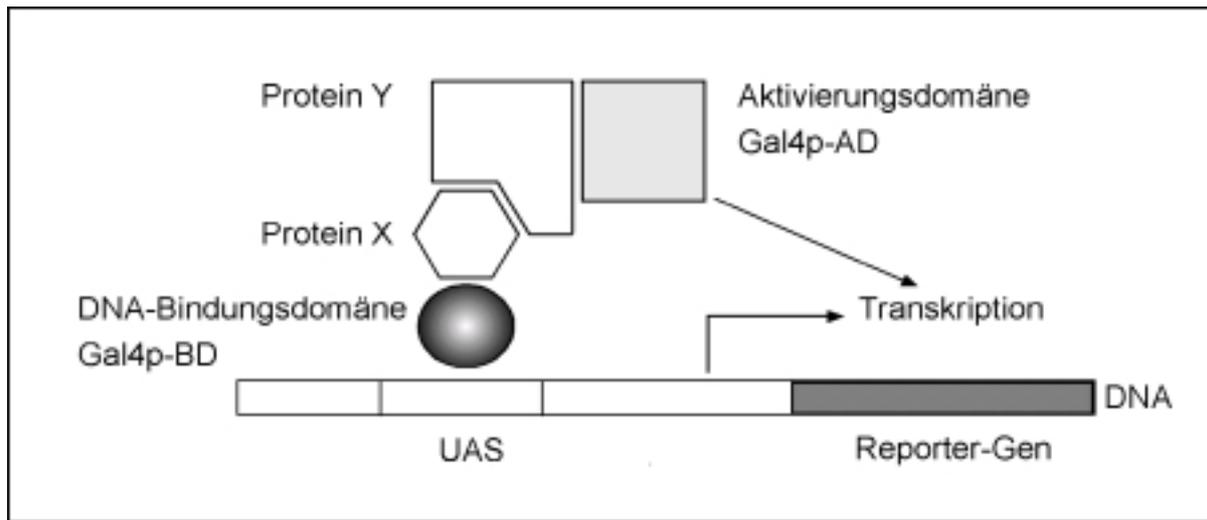


Abb. 3.1 Funktionsweise des Hefe Two-Hybrid Systems.

3.2 N- und C-terminale Verkürzungen von Pex13p

Bei der Erstellung der Verkürzungskonstrukte wurde sowohl die Lage von potentiellen Transmembrandomänen (TMD) als auch die bereits bekannte SH3-Domäne berücksichtigt.

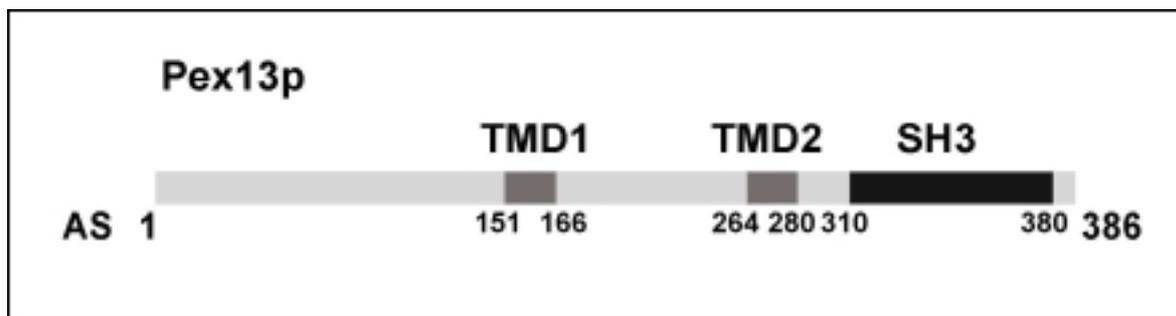


Abb. 3.2 Übersicht der Lage der Transmembrandomänen sowie der SH3-Domäne von Pex13p.

Sämtliche Pex13p Two-Hybrid Konstrukte wurden über die Schnittstellen *EcoRI* und *XbaI* in den Bluescript-Vektor kloniert (pKat1-pKat15, siehe 2.4). Die einklonierten Fragmente wurden dann über *EcoRI* und *SpeI* in pPC86 kloniert (pKat16-pKat30). Danach wurden die Inserts über einen *SmaI* und *SpeI* Verdau in pPC97 kloniert (pKat31-pKat45). Es erfolgte

eine Klonierung in beide Two-Hybrid Vektoren, da manche Konstrukte in einem der beiden Vektoren eine Autoaktivierung zeigen könnten. Die Klonierung erfolgte auch in beide Vektoren, um eine Interaktion mit Teilbereichen des gleichen Proteins zu analysieren. Klonierungen und Umklonierungen wurden jeweils mittels einer Restriktionsanalyse über Agarose-Gele überprüft (Gele nicht gezeigt). Eine Übersicht über die erstellten Konstrukte zeigt Abb. 3.3.

3.2.1 Interaktion von Pex7p mit der aminoterminalen Domäne von Pex13p

Es konnte gezeigt werden, dass Pex13p am Import von PTS2-haltigen Proteinen beteiligt ist (Girzalsky *et al.*, 1999). Die Beteiligung erfolgte über die Interaktion mit dem PTS2-Rezeptor Pex7p. Um die Bindestelle des PTS2-Rezeptors Pex7p an Pex13p näher zu charakterisieren, wurden in einem ersten Schritt die bereits vorgestellten Verkürzungskonstrukte in einem Two-Hybrid Assay eingesetzt und auf deren Fähigkeit, mit Pex7p, sowie mit den bekannten Interaktionspartnern Pex5p und Pex14p, zu interagieren überprüft.

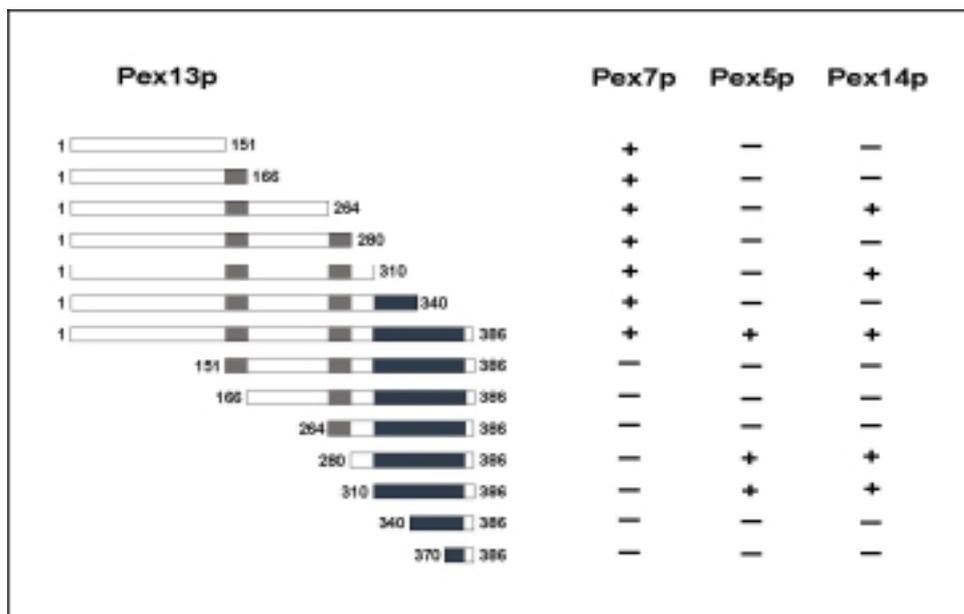


Abb. 3.3 Übersicht der N- und C-terminalen Verkürzungskonstrukte des integralen Membranproteins Pex13p. Die Verkürzungskonstrukte wurden jeweils in der Gal4p-BD und in der Gal4p-AD erstellt.

Wie in Abb. 3.3 ersichtlich, konnte gezeigt werden, dass keine der aminoterminalen Verkürzungen in der Lage waren, mit Pex13p zu interagieren, wohl aber mit Pex5p und Pex14p. Für letztere war dabei der Bereich von Aminosäure 310 bis 386 ausreichend. Dieser

Bereich beinhaltet die SH3-Domäne, die bereits früher als Interaktionsbereich für Pex14p und Pex5p beschrieben wurde (Albertini *et al.*, 1997). Ebenfalls konnte bestätigt werden, dass die SH3-Domäne mit Pex7p keine Interaktion eingeht. Von großem Interesse war nun die Beobachtung, dass alle getesteten C-terminalen Deletionen zu einer Interaktion mit Pex7p fähig waren. Die ersten 151 Aminosäuren von Pex13p, welche für eine Interaktion mit Pex7p ausreichend waren, wurden anschließend nochmals als Bindebereich für Pex5p und Pex14p getestet. Wie in Abb. 3.4 gezeigt, fand mit Pex5p und Pex14p allerdings keine Interaktion statt.

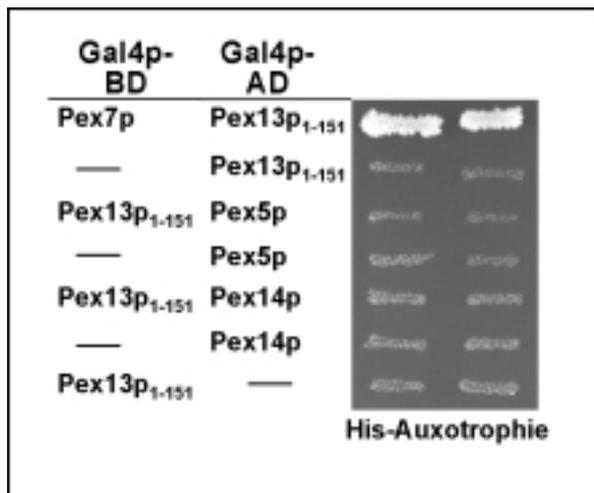
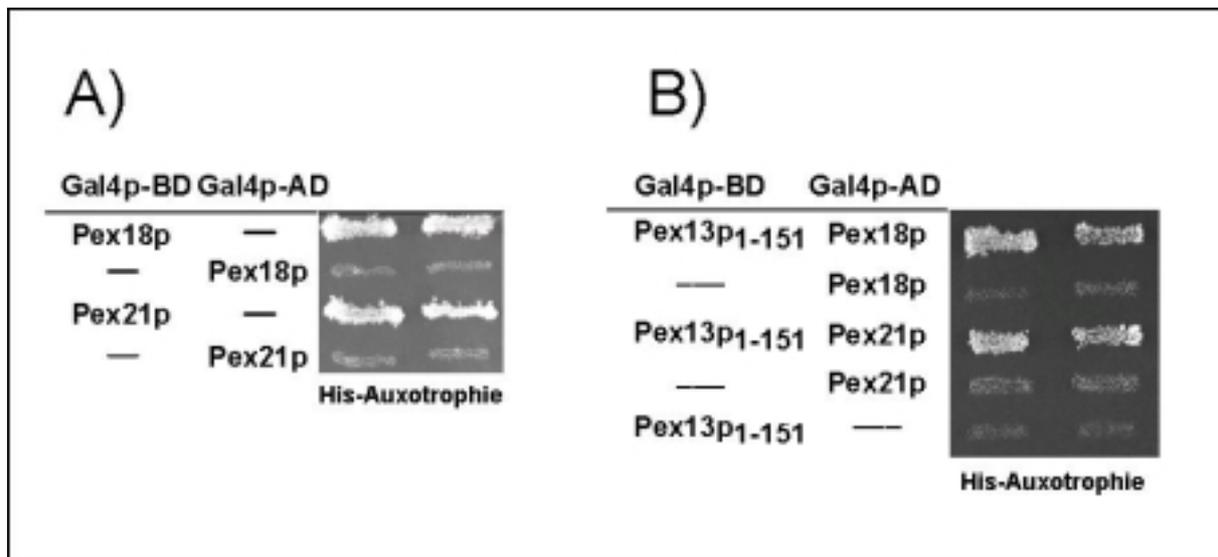


Abb. 3.4 Pex7p bindet den Aminoterminus von Pex13p. Two-Hybrid Analyse der Interaktion von Pex13p₁₋₁₅₁ mit Pex7p, Pex5p und Pex14p. Gezeigt wird die His-Prototrophie zweier unabhängiger Klone. Pex5p und Pex14p können mit dem Aminoterminus von Pex13p₁₋₁₅₁ nicht interagieren.

3.2.2 Pex18p, Pex21p und Pex7p interagieren mit der gleichen Region von Pex13p

Die Translokation von Proteinen mit einem peroxisomalen Targeting Signal 2 (PTS2) ist nicht nur von der Anwesenheit von Pex7p abhängig, sondern auch von den beiden redundanten Proteinen Pex18p und Pex21p (Purdue *et al.*, 1998). In Abwesenheit dieser hauptsächlich cytosolisch lokalisierten Proteine kann der PTS2-abhängige Import nicht stattfinden. Da diese beiden Proteine in der Lage sind, mit Pex7p zu interagieren, wird vermutet, dass ihre Aufgabe darin besteht, das mit Cargo-Proteinen beladene Pex7p an die peroxisomale Membran zu dirigieren (Purdue *et al.*, 1998). Deshalb wurde nun getestet, ob Pex18p oder Pex21p ebenfalls in der Lage sind, mit dem Aminoterminus von Pex13p zu interagieren.



(Abb. 3.5 Two-Hybrid Analyse von Pex18p und Pex21p. A) Autoaktivität der Gal4p-BD Pex18p/Pex21p-Fusionen. (—) bedeutet, dass zur Transformation nur der entsprechende Leervektor eingesetzt wurde. B) Interaktion von Pex18p und Pex21p mit dem N-Terminus von Pex13p. Die gezeigten Analysen erfolgten im Hefe-Reporterstamm HF7c. Dargestellt sind jeweils 2 unabhängige Doppeltransformatanten.

Die Expression von Pex18p bzw. Pex21p als Fusion mit der Gal4p-Bindedomäne führte zu einer Autoaktivierung (Abb. 3.5 A). In den folgenden Two-Hybrid Studien wurden deshalb ausschließlich die Fusionen von Pex18p und Pex21p mit der Gal4p-AD eingesetzt. Wenn nun diese beiden Fusionsproteine mit Pex13p coexprimiert wurden, zeigte sich, dass Pex18p und Pex21p in der Lage waren, mit den aminoterminalen 151 Aminosäuren von Pex13p zu interagieren (Abb. 3.5 B). Demzufolge konnte mit dem gleichen Bindebereich wie für Pex7p eine Two-Hybrid Interaktion mit Pex18p und Pex21p detektiert werden.

3.2.3 Einengung des Bindebereichs von Pex7p an Pex13p

Um den Bindungsbereich von Pex7p an Pex13p weiter einzuengen, wurde eine weitere Reihe von Verkürzungskonstrukten erstellt. Ausgehend von den für die Bindung ausreichenden ersten 151 Aminosäuren, erstreckten sich die nächsten Two-Hybrid Konstrukte von Aminosäure 1-100, 1-55 und 55-100. In einem Two-Hybrid Test wurde die Fähigkeit dieser Konstrukte mit Pex7p, mit Pex18p und Pex21p zu interagieren, getestet.

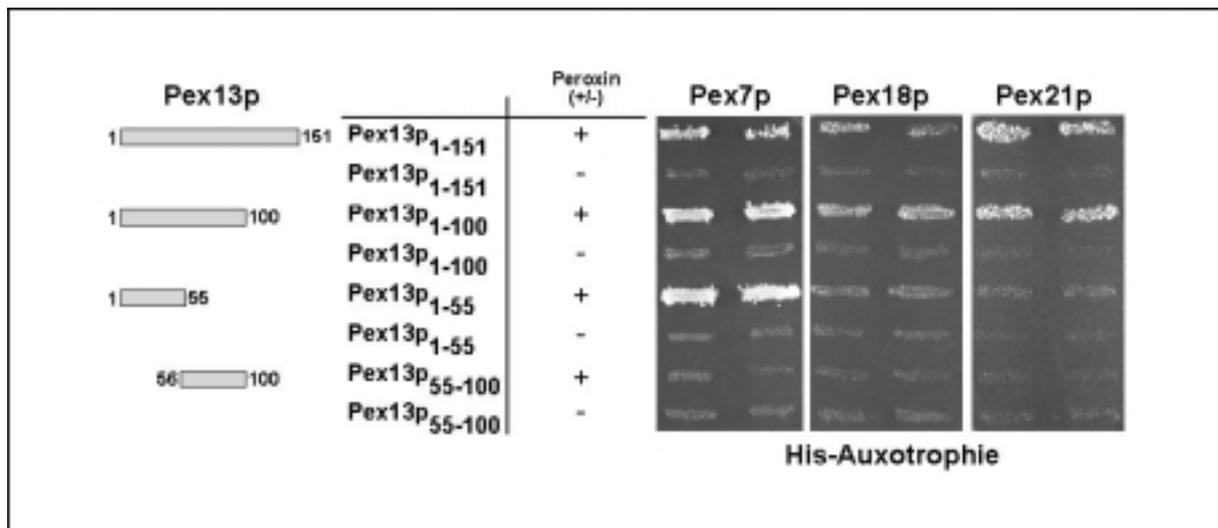


Abb. 3.6 Analyse der Interaktion zwischen Pex13p-Fragmenten und Pex7p, Pex18p und Pex21p. Pex7p wurde als Gal4p-BD Fusion, Pex18p und Pex21p als Gal4p-AD Fusion exprimiert. Gezeigt ist jeweils die Co-Expression des Pex13p-Fragments mit dem entsprechenden Peroxin (+), sowie nur die Expression des jeweiligen Fragments (-). Die Analyse erfolgte im Reporterstamm HF7c.

Das Pex13p₁₋₁₀₀ Konstrukt zeigte mit allen drei 3 getesteten Proteinen eine zumindest gleichstarke Interaktion wie mit Pex13p₁₋₁₅₁. Für die Interaktion mit Pex7p konnte zudem der Bindebereich auf die ersten 55 Aminosäuren von Pex13p eingeeengt werden. Hingegen sind für eine Interaktion mit Pex18p bzw. Pex21p die ersten 100 Aminosäuren notwendig, wenngleich die Interaktion dieses Bereichs mit Pex18p/Pex21p etwas schwächer erscheint als mit Pex7p, was sich darin zeigt, dass die Transformanten erst nach einer Inkubationszeit von ca. 10 Tagen in der Lage sind, auf den Selektionsplatten zu wachsen. Der Bereich Pex13p₅₅₋₁₀₀ konnte mit keinem der drei getesteten Proteinen eine Interaktion eingehen.

3.2.3.1 Erstellung und Überprüfung der Doppeldelentionsmutante

HF7c *pex18Δpex21Δ*

Da die beobachteten Interaktionen zwischen Pex13p/Pex7p, Pex13p/Pex18p und Pex13p/Pex21p in einem homologen System gefunden wurden, musste ausgeschlossen werden, dass es sich dabei um eine indirekte Interaktion handelt. Um dies zu klären, sollten die Interaktionen in den Gendelentionsmutanten *pex7Δ* bzw. *pex18Δpex21Δ* erneut getestet werden. Dazu war es jedoch notwendig, die Doppeldelentionsmutante *pex18Δpex21Δ* zu erstellen. Hierzu wurde aus dem vorhandenen Stamm HF7c*pex18Δ::KanMX4* genomische DNA hergestellt und mit dem Primerpaar RE 221 und RE 222 die auf dem KanMX4 Modul basierende *PEX18*-Deletionskassette amplifiziert (Güldener *et al.*, 1996). Dieses PCR-Produkt wurde anschließend zur Deletion von *PEX18* in den Stämmen HF7c*pex21Δ* und

UTL7-*Apex21* Δ verwendet. Die korrekte Integration wurde mit Hilfe einer PCR-Reaktion überprüft (Abb. 3.7).

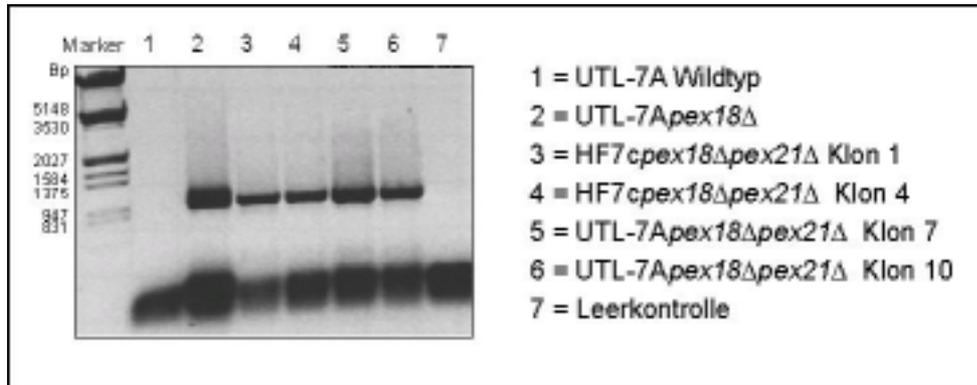


Abb. 3.7 Überprüfung der Doppeldeletionsmutanten UTL-7A*pex18* Δ *pex21* Δ und HF7c*pex18* Δ *pex21* Δ . Gezeigt ist ein 1%iges Agarosegel mit jeweils 1/10 Volumen jedes PCR-Ansatzes. Als Template für die PCR-Reaktion dienten je ca. 0,5 μ g genomische DNA des Wildtyps UTL-7A (Spur 1), der Mutante *pex18* Δ (Spur 2) und der möglichen Doppeldeletionsmutanten (Spur 3-6). In Spur 7 wurde die PCR ohne genomische DNA durchgeführt (Leerkontrolle). Als Primer dienten RE 223 (350 bp vor dem *PEX18* ORF) und RE 132 (homolog zu einem Bereich innerhalb des KanMX4-Moduls).

Während aus der genomischen DNA des Wildtyps gemäß den Erwartungen keine DNA-Amplifikation erfolgte, führte die Verwendung genomischer DNA der *PEX18*-Mutante zu einem Amplifikationsprodukt mit der ermittelten Größe von 1159 bp. Bei Verwendung der genomischen DNA der putativen Doppeltransformanten wurde ein PCR-Produkt der gleichen Größe wie im Falle der Einfachdeletion erhalten. Die PCR-Reaktion bestätigte somit die korrekte Deletion von *PEX18* in der *pex21* Δ -Mutante, sowohl im Stamm UTL-7A, als auch im Two-Hybrid Reporterstamm HF7c.

3.2.4 *Pex18p/Pex21p* binden *Pex13p* über *Pex7p*

Da der Bindungsbereich zwischen *Pex7p* und *Pex13p* bzw. *Pex18/21p* und *Pex13p* gewisse Ähnlichkeiten aufwies, lag die Vermutung nahe, dass *Pex18p* und *Pex21p* zusammen mit *Pex7p* als Komplex an *Pex13p* binden. Um diese Frage zu klären, erfolgte ein weiterer Two-Hybrid Test mit den entsprechenden Fusionsproteinen im Wildtyp, in HF7c*pex7* Δ und in HF7c*pex18* Δ *pex21* Δ . Zur Analyse wurden die ersten 100 Aminosäuren von *Pex13p* eingesetzt, derjenige Bereich von *Pex13p*, der als bislang kürzester Bereich sowohl mit *Pex7p* als auch mit *Pex18p* und *Pex21p* in der Lage war, zu interagieren.

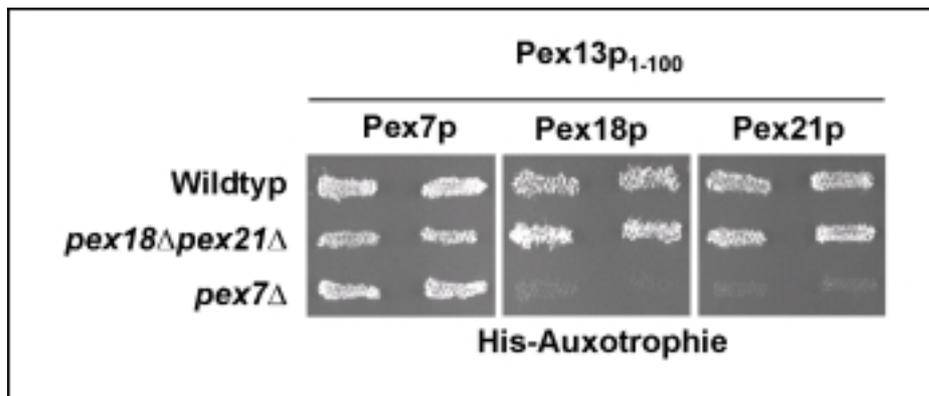


Abb. 3.8 Two-Hybrid Analyse der Interaktion von Pex13p₁₋₁₀₀ mit Pex7p, Pex18p und Pex21p. Die Analyse erfolgte im Wildtyp, in HF7cpex7Δ und in HF7cpex18Δpex21Δ. Doppeltransformanten mit der Expression der angezeigten Fusionsproteine wurden auf SD-Agarplatten ohne Leucin und Tryptophan selektioniert und zum Nachweis einer Histidin-Prototrophie auf SD-Agarplatten ohne Histidin, Leucin und Tryptophan mit 5 mM 3-Aminotriazol repliziert. Gezeigt werden jeweils 2 unabhängige Klone.

Die Doppeltransformanten von Pex13p₁₋₁₀₀ mit Pex7p bzw. mit Pex18p und Pex21p führten sowohl im Wildtyp wie auch in der *pex18Δpex21Δ* Mutante zur Aktivierung des Reportergens und somit zur His-Prototrophie. Dieses Ergebnis bedeutete, dass Pex7p auch ohne die beiden Proteine Pex18p und Pex21p an Pex13p binden konnte. Im Gegensatz hierzu zeigten die Doppeltransformanten Pex13p₁₋₁₀₀ mit Pex18p bzw. mit Pex21p in *pex7Δ* keine Reporteraktivierung. Die Interaktion dieser Proteine war demnach abhängig von der Anwesenheit von Pex7p. Dies mag auch das Ergebnis von Abb. 3.6 erklären, wo die Interaktion von Pex13p₁₋₁₀₀ mit Pex18p bzw. mit Pex21p etwas schwächer erscheint als die Interaktion des gleichen Bereiches mit Pex7p. Weiterhin könnte die Tatsache, dass hier eine indirekte Bindung zwischen Pex13p und Pex18p respektive Pex21p vorliegt, erklären, warum die ersten 55 Aminosäuren von Pex13p nicht mehr in der Lage sind, mit Pex18p/Pex21p zu interagieren.

3.2.5 Pex7p-Docking in Abwesenheit von Pex18p/Pex21p

Die Interaktion von Pex13p mit Pex7p sollte nun durch eine unabhängige Methode bestätigt werden. Hierfür wurde eine Co-Immunopräzipitation durchgeführt. Diese Methode erlaubt die Immunisolierung eines Proteins aus einem Zellhomogenat, woraufhin die Detektion eventuell copräzipitierter Proteine erfolgt. Es sollte analysiert werden, ob Pex7p mit Pex13p in Abwesenheit von Pex18p und Pex21p assoziiert vorliegt. Als Kontrolle wurde die Assoziation in einem *pex14Δ* Stamm analysiert. Zellen des Wildtyps UTL-7A, sowie der ansonsten isogenen Stämmen *pex13Δ*, *pex14Δ*, *pex18Δ* und *pex18Δpex21Δ* wurden mit dem Plasmid YEpmyc-Pex7p (Marzioch *et al.*, 1994) transformiert, welches die Expression eines aminoterminal mit einem myc-Epitop versehenen Pex7p ermöglichte. Dessen Expression

konnte über den vorgeschalteten *CUP1* Promotor mit CuSO_4 induziert werden. Die Immunpräzipitation des *myc-Pex7p* wurde mittels monoklonaler α -*myc*-Antikörper, die an α -Maus-IgG-Magnetkugeln gekoppelt waren, durchgeführt. Nach Inkubation und anschließender intensiver Waschung des Immunkomplexes wurden die gebundenen Proteine durch Aufnahme der Magnetkugeln in SDS-Probenpuffer eluiert und immunologisch analysiert.

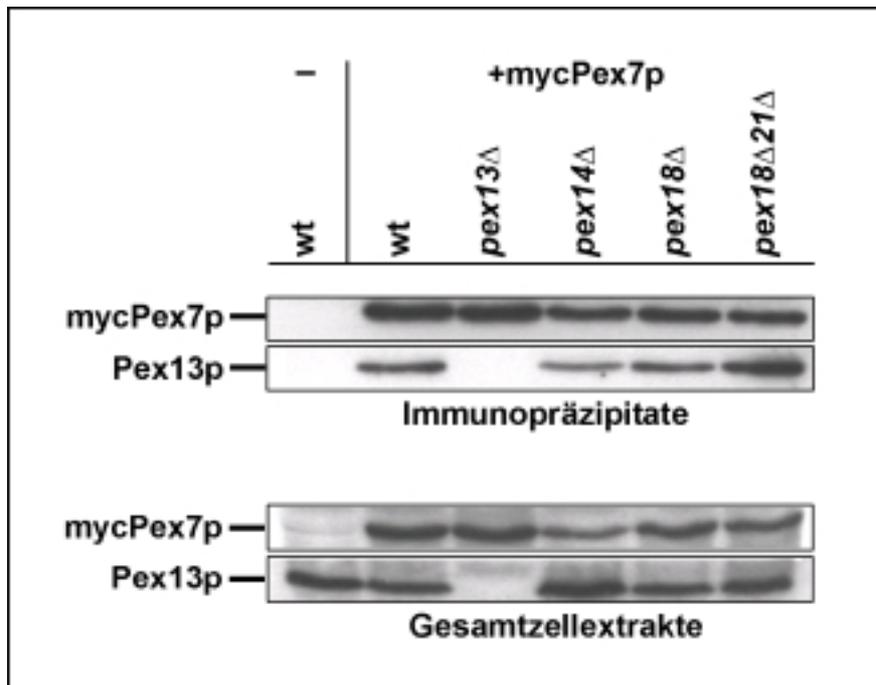


Abb. 3.9 Pex7p bindet in Abwesenheit von Pex18p und Pex21p an Pex13p. Aus dem UTL-7A Wildtyp Stamm, sowie den mit *myc-Pex7p* transformierten Stämmen UTL-7A, *pex13* Δ , *pex14* Δ , *pex18* Δ und *pex18* Δ *pex21* Δ wurde *myc-Pex7p* immunopräzipitiert und darin die Anwesenheit von Pex13p analysiert. Gleiche Volumenanteile der Präzipitate (1/10 des Ansatzes, obere Abbildung) und der eingesetzten Extrakte (1/200 des Ansatzes, untere Abbildung) wurden mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese getrennt und auf einer Nitrozellulose immobilisiert. Die Membranen wurden mit α -*myc*- bzw. α -Pex13p-Antikörper inkubiert und die Immunokomplexe unter Verwendung des ECL-Systems detektiert.

Die Analyse der eingesetzten Homogenate zeigte, dass der Expressionslevel von Pex7p bzw. von Pex13p in allen Extrakten in etwa gleich hoch war. Wie Abb. 3.9 zeigt, detektierte der α -*myc*-Antikörper eine Proteinbande in Höhe von 45 kDa in den Immunopräzipitaten der transformierten Zellen, nicht aber im Kontrollansatz. Die Bande war somit für das *myc*-markierte Pex7p spezifisch. Im transformierten Wildtyp konnte Pex13p mit Pex7p copräzipitiert werden (Spur 2). Dies war ebenso in Abwesenheit von Pex14p der Fall (Spur 4). Die gleiche Beobachtung konnte in *pex18* Δ *pex21* Δ -Stämmen gemacht werden. Dies lässt auf eine Interaktion von Pex13p mit Pex7p schließen, die unabhängig von Pex18p/Pex21p ist.

3.2.6 *Pex7p* aus *S. cerevisiae* bindet *in vitro* an *Pex13p*₁₋₁₀₀

Nachdem gezeigt werden konnte, dass *Pex7p* auch in Abwesenheit von *Pex18p* und *Pex21p* in der Lage war, mit den ersten 100 Aminosäuren von *Pex13p* zu interagieren (siehe Abb. 3.6), sollte nun überprüft werden, ob diese Interaktion direkt ist. Dazu sollte die *Pex7p*-*Pex13p* Interaktion *in vitro* analysiert werden. Die ersten 100 Aminosäuren von *Pex13p* sollten sowohl als GST-Fusion wie auch als MBP-Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert werden. Die Analyse der mit IPTG induzierten Expression und die Aufreinigung der beiden Fusionskonstrukte wird in der folgenden Abbildung dargestellt.

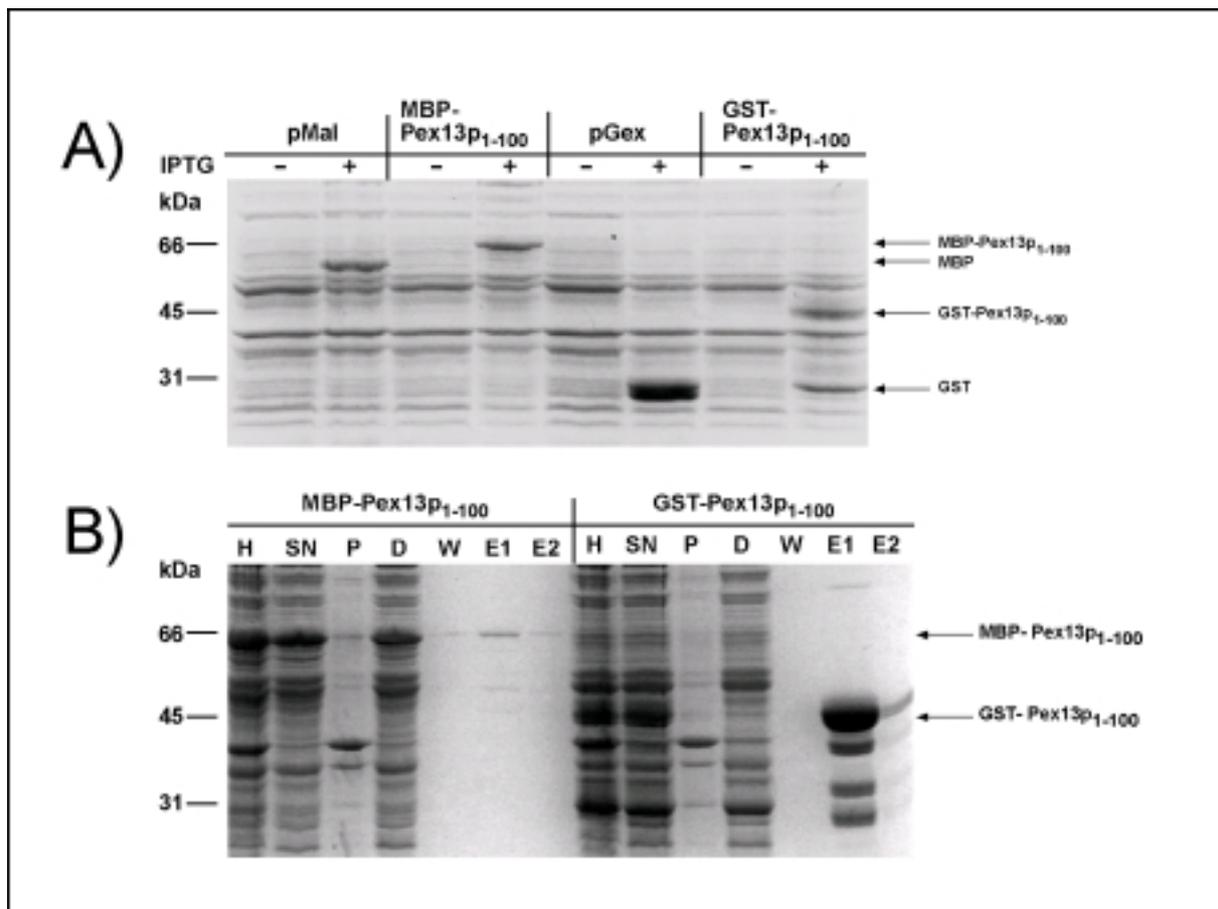


Abb. 3.10 Expression und Reinigung von *Pex13p*₁₋₁₀₀ über eine GST-Sepharose-Säule und über eine Amylose-Säule. A) Induzierbarkeit der *Pex13p*₁₋₁₀₀-Fusionsproteine. Jeweils äquivalente Zellmengen wurden vor (-) und nach der Induktion (+) mit 0,3 mM IPTG für 3 h abgenommen, mit 2 x SDS-Probenpuffer versetzt und auf einem 12 %igen SDS-Gel analysiert. B) Aufreinigung der selben Fusionsproteine. Dargestellt sind äquivalente Anteile, der einzelnen Reinigungsschritte. Dabei bedeuten H= Homogenat, SN= Überstand, P= Pellet, D= Durchlauf, W= Waschschrift, E1 und E2= Elutionsschritt 1 und 2.

Wie aus Abb. 3.10 A) hervorgeht, ließen sich die beide Fusionsproteine in *E. coli* exprimieren. Bei der nachfolgenden Reinigung stellte sich heraus, dass die Menge an eluierbarem GST-*Pex13p*₁₋₁₀₀ deutlich höher als der eluierbare Anteil an MBP-*Pex13p*₁₋₁₀₀ war. MBP-

Pex13p₁₋₁₀₀ war nämlich hauptsächlich im Durchlauf zu finden. Aus diesem Grund wurden die folgenden *in vitro* Bindungsstudien mit dem an GST fusionierten Pex13p₁₋₁₀₀ durchgeführt.

In einem ersten Ansatz wurde eine sogenannte *semi in vitro* Bindungsstudie durchgeführt, bei der GST-Pex13p₁₋₁₀₀ an eine Sepharose-Matrix gebunden wurde. Als Leerkontrolle wurde der GST-Fusionsanteil ohne zusätzliches Protein an GST-Sepharose-Matrix gebunden. Nach einer einstündigen Inkubation wurde jeweils ungebundenes Protein abgetrennt und die Säule gewaschen. Anschließend wurden gleiche Mengen an Hefelysaten aus untransformierten Wildtypzellen oder aus mit *myc*-Pex7p transformiertem Wildtyp bzw. *pex18Δpex21Δ* Mutantenzellen auf das an die Matrix gebundene GST-Pex13p₁₋₁₀₀ oder GST Protein gegeben. Nach Waschen der Matrix wurde mit 10 mM Glutathion-haltigem Elutionspuffer eluiert. Von den Eluaten wurden äquivalente Mengen abgenommen, mit SDS-Probenpuffer versetzt und die Proben über einen Immunoblot bzw. über Coomassie-Färbung analysiert. Als Nachweis für gebundenes Pex7p wurde ein monoklonaler α -*myc*-Antikörper eingesetzt.

myc-Pex7p konnte in Anwesenheit von Pex13p₁₋₁₀₀ von der Säule eluiert werden, unabhängig davon, ob *myc*-Pex7p im Wildtyp oder in der *pex18Δpex21Δ* Mutante exprimiert worden war. Wurde Hefelysat von untransformierten Zellen an GST-Pex13p₁₋₁₀₀ gebunden, wurde keine Bande auf Höhe des *myc*-Pex7p nachgewiesen. Ebenso konnte *myc*-Pex7p nicht an GST alleine binden (Spur 4 und 5). Daraus kann der Schluss gezogen werden, dass die Aminosäuren 1-100 des Aminoterminus von Pex13p die Bindestelle von Pex7p darstellen und dass dessen Bindung auch in Abwesenheit von Pex18p und Pex21p erfolgen kann.

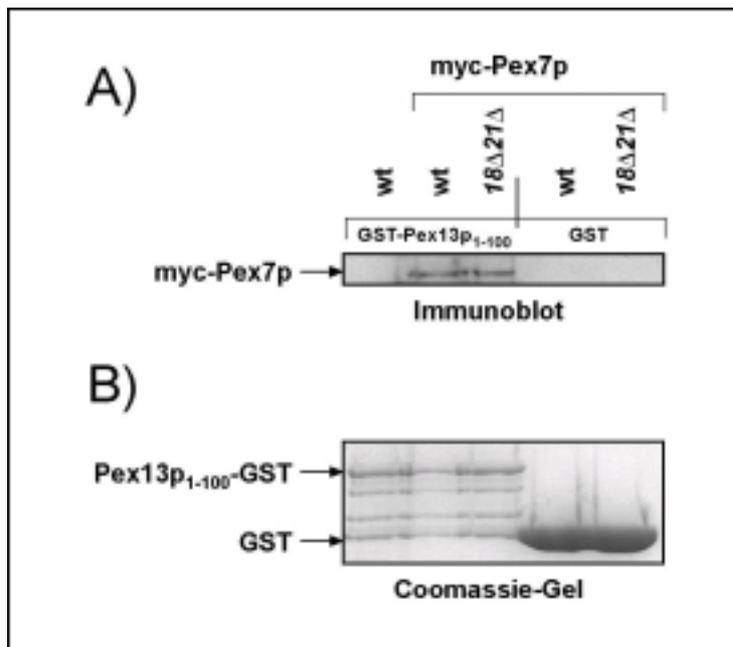


Abb. 3.11 *Semi in vitro* Bindung von *myc-Pex7p* an *Pex13p₁₋₁₀₀*. **A)** *myc-Pex7p* interagiert spezifisch mit *GST-Pex13p₁₋₁₀₀*. Gleiche Mengen von *GST* und *GST-Pex13p₁₋₁₀₀* wurden an eine Sepharose Matrix gebunden und mit Gesamtzellextrakten von UTL-7A, *myc-Pex7p* transformiertem Wildtyp oder *myc-Pex7p* transformierten *pex18Δpex21Δ* Zellen inkubiert. Die Analyse erfolgte über einen Immunoblot mit einem α -*myc*-Antikörper. **B)** Die Anwesenheit von *GST* und *GST-Pex13p₁₋₁₀₀* in den eingesetzten Eluaten wurde über ein Coomassie gefärbtes Gel ermittelt. *GST-Pex13p₁₋₁₀₀* war relativ instabil, es traten jeweils 3 weitere Abbaubanden auf.

3.2.7 *Pex7p* aus *E. coli* bindet *in vitro* an *Pex13p₁₋₁₀₀*

Um die Möglichkeit auszuschließen, dass ein weiteres, eventuell unbekanntes Protein die Bindung zwischen *myc-Pex7p* und *Pex13p₁₋₁₀₀* vermittelt, sollten beide Proteine heterolog in *E. coli* exprimiert werden. Hierzu wurde ein *His₆-Pex7p* Fusionskonstrukt (X.Hong, FU Berlin) eingesetzt. Nach Ermittlung der Induktions- und Löslichkeitsbedingungen (Daten nicht gezeigt) erfolgte dessen native Aufreinigung. Für die *in vitro* Bindung zwischen *Pex13p₁₋₁₀₀* und *Pex7p* wurde der Überstand mit dem löslichen Anteil von *His₆-Pex7p* auf eine *GST*-Sepharose gegeben, die zuvor mit den löslichen Überständen von *GST-Pex13p₁₋₁₀₀* bzw. *GST* alleine inkubiert worden waren. Es folgte eine einstündige Inkubation der beladenen Säulen bei 4°C. Nach intensivem Waschen wurden die Proteine mit 10 mM Gluthation eluiert. Gleiche Mengenteile wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt und über einen Immunoblot bzw. über ein Coomassie-gefärbtes SDS-Gel analysiert. Mit einem α -*Pex7p* Antikörper sollte im Immunoblot *Pex7p* detektiert werden.

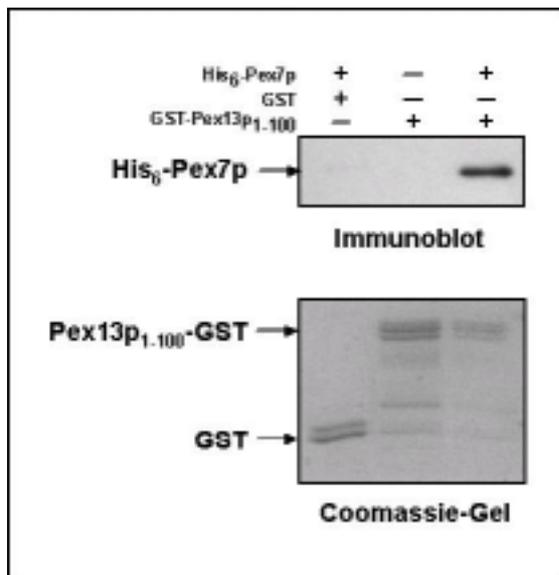


Abb. 3.12 *In vitro* Bindung von Pex7p an Pex13p. Gleiche Mengen von GST und GST-Pex13p₁₋₁₀₀ wurden an eine GST-Sepharose Matrix gebunden. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem löslichen Überstand von bakteriell exprimierten His₆-Pex7p (+) oder mit einem leeren His₆-Vektor transformierten *E.coli* Überstand (-). An GST-Pex13p₁₋₁₀₀ gebundenes His₆-Pex7p wurde im Immunoblot mit einem α -Pex7p Antikörper detektiert. Im Coomassie-Gel wird die Anwesenheit von GST und GST-Pex13p₁₋₁₀₀ in den untersuchten Eluaten gezeigt.

Auf dem in Abb. 3.12 dargestellten Immunoblot ist zu sehen, dass Pex7p nur in Anwesenheit von GST-Pex13p₁₋₁₀₀ detektiert werden konnte. In *E.coli* exprimiertes Pex7p band dabei spezifisch an die ersten 100 Aminosäuren von Pex13p, während sich bei Inkubation von His₆-Pex7p mit GST kein Signal fand. Als Kontrolle für die Anwesenheit von eluiertem GST und GST-Pex13p₁₋₁₀₀ wurden in einem Coomassie-Gel jeweils 1/20 der Überstände aufgetragen. Mit diesem Nachweis konnte erstmals eine *in vitro* Bindung zwischen Pex7p und Pex13p gezeigt werden.

3.2.8 Der aminoterminal Bereich von Pex13p ist für den PTS2-abhängigen Matrixprotein-Import notwendig

Nachdem anhand des Hefe Two-Hybrid Systems und über *in vitro* Bindungsstudien gezeigt werden konnte, dass Pex7p an den aminoterminalen Bereich von Pex13p bindet, sollte nun untersucht werden, ob dieser Bereich von Pex13p am Import von PTS2 enthaltenen Matrixproteinen beteiligt ist. Um dieser Frage nachzugehen, sollte ein Pex13p Konstrukt erstellt werden, in dem dieser Bereich fehlt. Da in einer Two-Hybrid-Analyse gezeigt werden konnte, dass bereits die ersten 55 Aminosäuren, nicht aber Aminosäure 55-100 von Pex13p in der Lage sind, mit Pex7p zu interagieren, wurde die Klonierung so konzipiert, dass nur dieser Aminosäurebereich fehlt, um möglichst geringe Änderungen einzuführen. In der Literatur gibt es einige Beispiele dafür, dass durch die Überexpression eines Proteins dessen Funktion verändert wird (Elgersma *et al.*, 1997). Um dieses Phänomen auszuschließen, wurde der endogene Pex13p-Promotor inkloniert, der das Expressionsniveau der Pex13p-Verkürzung weitgehend auf dem natürlichen Niveau halten sollte (Abb. 3.13). Nach dem gleichen Prinzip

wie für das verkürzte Protein Pex13_{p56-386} wurde ein Kontrollkonstrukt zur Expression von Pex13_{p1-386} erstellt.

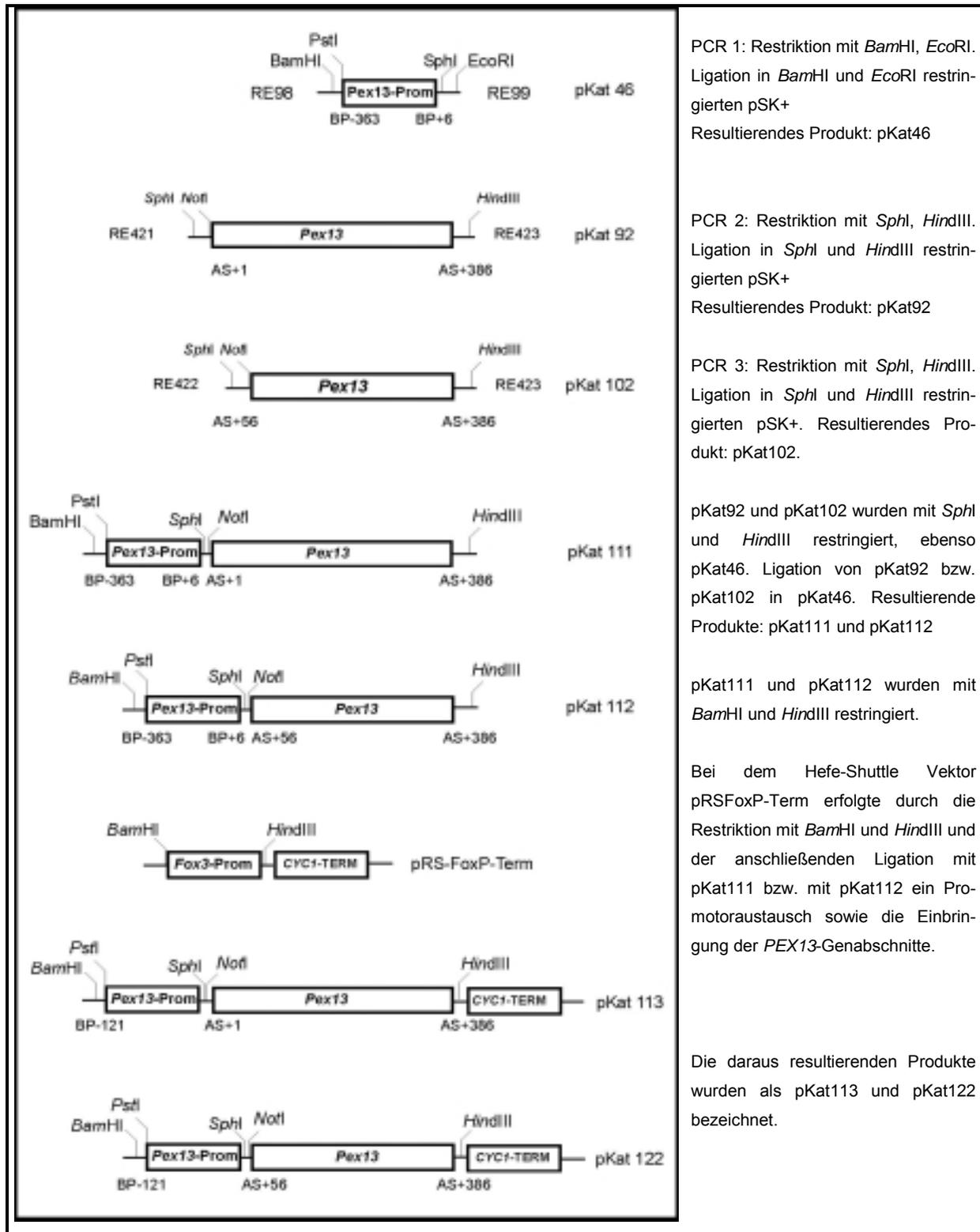


Abb. 3.13 Klonierungsstrategie für pKat113 (Pex13_{p1-386}) bzw. pKat 122 (Pex13_{p56-386}) unter Kontrolle des endogenen Promotors in pRSFoxP-Term.

Die Expression von Pex13p₁₋₃₈₆ und Pex13p₅₆₋₃₈₆ in UTL-7A*pex13Δ* Zellen wurde anschließend in Gesamtzell-Lysaten dieser Stämme untersucht. Die Immunoblot-Analyse machte deutlich, dass Pex13p₁₋₃₈₆ stabil exprimiert wurde, ersichtlich durch eine Bande in Höhe von 42 kDa. Die aminoternale Verkürzung wurde schwächer, aber ebenfalls stabil exprimiert, die Bande erscheint in Höhe von 38 kDa, während in der untransformierten Mutante der Antikörper lediglich eine unspezifische Bande in Höhe von ca. 28 kDa erkannte, wie sie auch in den beiden transformierten Stämmen erschien.

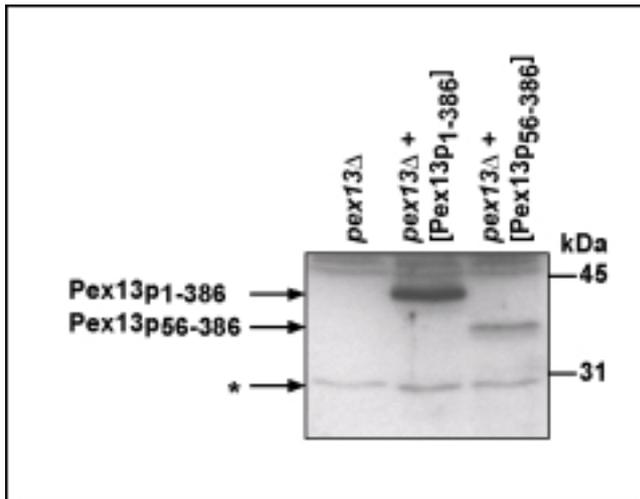


Abb. 3.14 Expression von Pex13p₁₋₃₈₆ bzw. Pex13p₅₆₋₃₈₆. Gesamtzellextrakte von UTL-7A*pex13Δ* transformiert mit Pex13p₁₋₃₈₆ bzw. mit Pex13p₅₆₋₃₈₆ wurden in einem Immunoblot auf das Vorhandensein von Pex13p bzw. Pex13p₅₆₋₃₈₆ analysiert. Als Antikörper wurde α -Pex13p eingesetzt. Die durch einen * markierte Bande weist auf eine Kreuzreaktion des Antikörpers hin.

Um nun die Funktionalität des aminoterminal verkürzten Pex13p zu überprüfen, wurden dieselben Stämme einem Wachstumstest auf Ölsäureplatten unterzogen. Als Positivkontrolle wurde der Wildtyp und als Negativkontrolle die untransformierte *pex13Δ* Mutante eingesetzt.

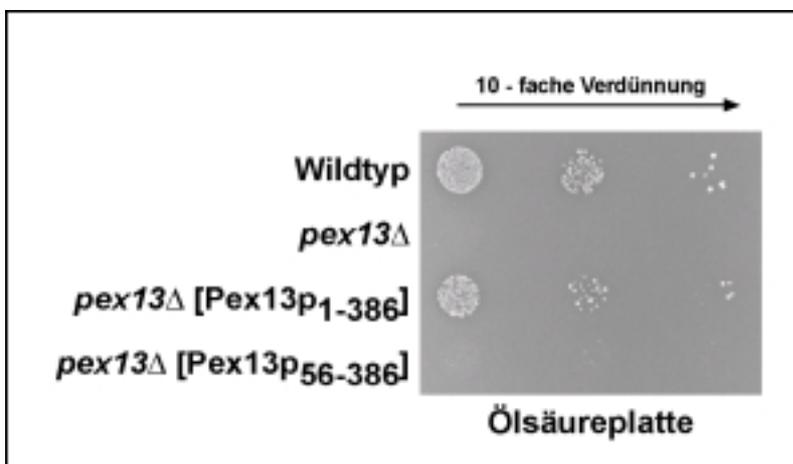


Abb. 3.15 Komplementationsanalyse von Pex13p₁₋₃₈₆ bzw. Pex13p₅₆₋₃₈₆ in UTL-7A*pex13Δ*. Der Wildtyp, die Mutante *pex13Δ* und die Transformanten wurden in drei verschiedenen Verdünnungsstufen auf Ölsäureplatten getüpfelt und bis zur charakteristischen Hofbildung 5 Tage bei 30°C inkubiert.

Abb. 3.15 zeigt eine Analyse der beiden Transformanten hinsichtlich der Wachstumsfähigkeit auf ölsäurehaltigem Medium. Die aminoterminal verkürzte Pex13p Transformante zeigte dabei das gleiche Erscheinungsbild wie die untransformierten Zellen der Mutante *pex13Δ*. Das Kontrollkonstrukt dagegen wies das gleiche Wachstumsverhalten wie der Wildtyp auf, war also in der Lage, Ölsäure zu verwerten und die dafür charakteristischen Höfe zu bilden. Das unterschiedliche Wachstumsverhalten der beiden Transformanten ließ den Schluss zu, dass der Aminoterminus von Pex13p für die Funktion dieses Peroxins von essentieller Bedeutung ist.

3.2.8.1 Lokalisation von DsRed

Um den PTS2-abhängigen Proteinimport weiter zu analysieren, wurde ein Konstrukt verwendet, welches aus den 16 aminoterminalen Aminosäuren der Thiolase und dem rot fluoreszierenden Protein DsRed besteht (H. Rottensteiner, FU Berlin). Dieses Konstrukt wurde stabil ins Genom der Stämme UTL7-A, *pex7Δ*, *pex13Δ* und *pex18Δpex21Δ* integriert und die Lokalisation des Markerproteins anschließend im Fluoreszenzmikroskop analysiert. Als Kontrolle wurde DsRed ohne Targetingsequenz in den Wildtyp transformiert.

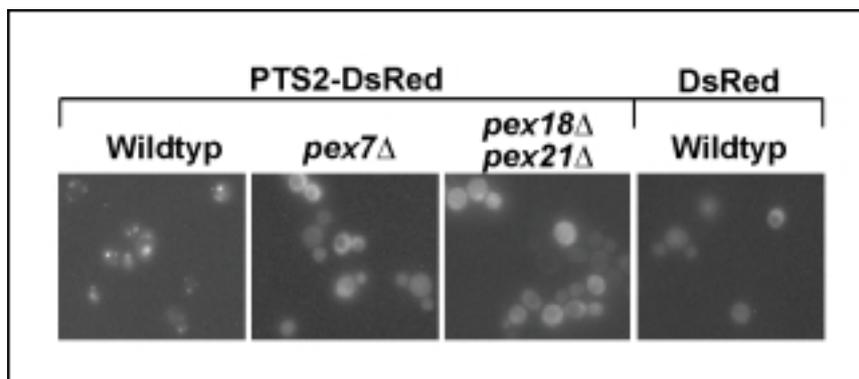


Abb. 3.16. Lokalisation der fluoreszierenden Markerproteine PTS2-DsRed und DsRed in unterschiedlichen Hefestämmen. Die angegebenen Stämme (UTL-7A sowie die isogenen Stämme *pex7Δ* und *pex18Δpex21Δ*) welche alle das Markerprotein PTS2-DsRed exprimierten, wurden auf Ölsäureplatten ausgestrichen. Nach 3 Tagen wurde die intrazelluläre Verteilung von DsRed fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Als Kontrolle wurde der Wildtyp mit DsRed ohne Targetingsignal analysiert.

PTS2-DsRed wurde im Wildtyp in die Peroxisomen transportiert, sichtbar am punktierten Leuchten der Zellen (Abb. 3.16). In den Mutanten, die einen PTS2-abhängigen Import-Defekt aufweisen, war erwartungsgemäß cytosolisches Leuchten zu sehen. Ohne Targetingsignal wurde DsRed auch nicht in die Peroxisomen des Wildtyps transportiert, auch hier wurde cytosolisches Leuchten beobachtet. Somit konnte PTS2-DsRed als Markerprotein für die folgenden Experimente eingesetzt werden.

3.2.9 Analyse des Targetings von Pex13p

Um die Ursache für das Wachstumsverhalten von Pex13p₅₆₋₃₈₆ auf Ölsäure zu analysieren, sollte überprüft werden, ob durch die aminoterminal Deletion des Proteins dessen Targeting beeinflusst wurde. Eine Methode zur Analyse des Targetings von peroxisomalen Proteinen ist der Einsatz des grün fluoreszierenden Proteins GFP. Der offene Leserahmen des Pex13p, sowie des aminoterminal deletierten Pex13p₁₅₁₋₃₈₆ wurde deshalb C-terminal mit GFP fusioniert. Beide Pex13p-Fusionsproteine wurden in Zellen transformiert, welche ebenso PTS2-DsRed aufwiesen.

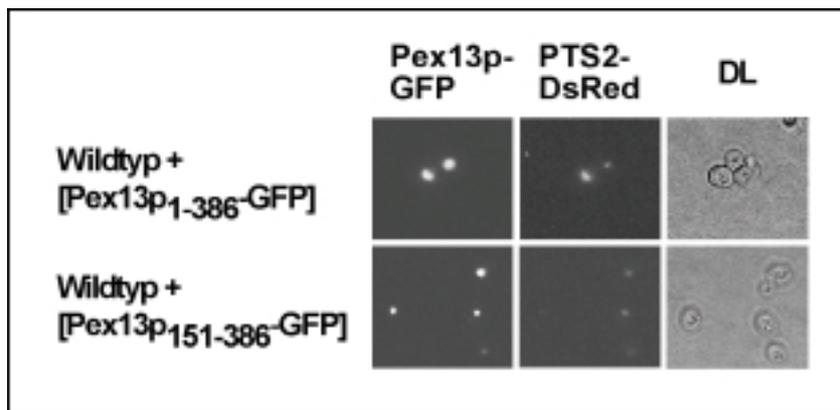


Abb. 3.17 Peroxisomale Lokalisation von Pex13p₁₅₁₋₃₈₆. Der PTS2-DsRed exprimierende UTL-7A Stamm wurde mit Pex13p₁₋₃₈₆-GFP bzw. Pex13p₁₅₁₋₃₈₆-GFP transformiert. Die Zellen wurden im Fluoreszenzmikroskop auf die Fluoreszenz von GFP (Pex13p-GFP) und DsRed (PTS2-DsRed) analysiert. Das Durchlicht (DL) zeigt die strukturelle Beschaffenheit der Zellen.

Sowohl das gesamte Pex13p wie auch das verkürzte Protein zeigten ein punktiertes Leuchtmuster, welches teilweise den Eindruck von clusterähnlichen Strukturen erweckte. Das punktierte Muster der beiden Fusionsproteine war deckungsgleich mit dem des peroxisomalen Markerproteins PTS2-DsRed, was auf eine peroxisomale Lokalisation der Fusionsproteine schließen ließ. Es kann davon ausgegangen werden, dass diese clusterähnliche Struktur keinen nachteiligen Einfluss auf den peroxisomalen Proteinimport ausübt, da eine *pex13Δ* Mutante, die mit Pex13p₁₋₃₈₆-GFP transformiert wurde, ein wildtypähnliches Wachstum auf Ölsäure aufwies (Daten nicht gezeigt).

3.2.10 Unabhängige Bindestellen für den PTS2- und für den PTS1-abhängigen Proteinimport in Pex13p

Nachdem gezeigt wurde, dass Pex13p trotz einer aminoterminalen Deletion korrekt peroxisomal lokalisiert vorlag, sollte als nächstes analysiert werden, ob die ersten 55 Aminosäuren

für den peroxisomalen Matrixprotein-Import notwendig sind. Hierzu wurde die subzelluläre Verteilung der fluoreszierenden Markerproteine für den PTS1- und PTS2-Proteinimport analysiert. Um den PTS1-abhängigen Proteinimport zu untersuchen, wurde GFP mit der PTS1-Signalerkennungssequenz SKL fusioniert (Lametschwandtner *et al.*, 1998) (I. Heiland, FU Berlin), während für den PTS2-abhängigen Import das bereits beschriebene PTS2-DsRed Konstrukt (pHPR131) eingesetzt wurde. In UTL7-*Apex13Δ* Zellen wurde nun sowohl PTS2-DsRed und GFP-SKL als auch Pex13p₁₋₃₈₆ bzw. Pex13p₅₆₋₃₈₆ exprimiert. Die erhaltenen Stämme wurden nach 3 Tagen Inkubation auf Ölsäureplatten im Immunfluoreszenz-Mikroskop analysiert.

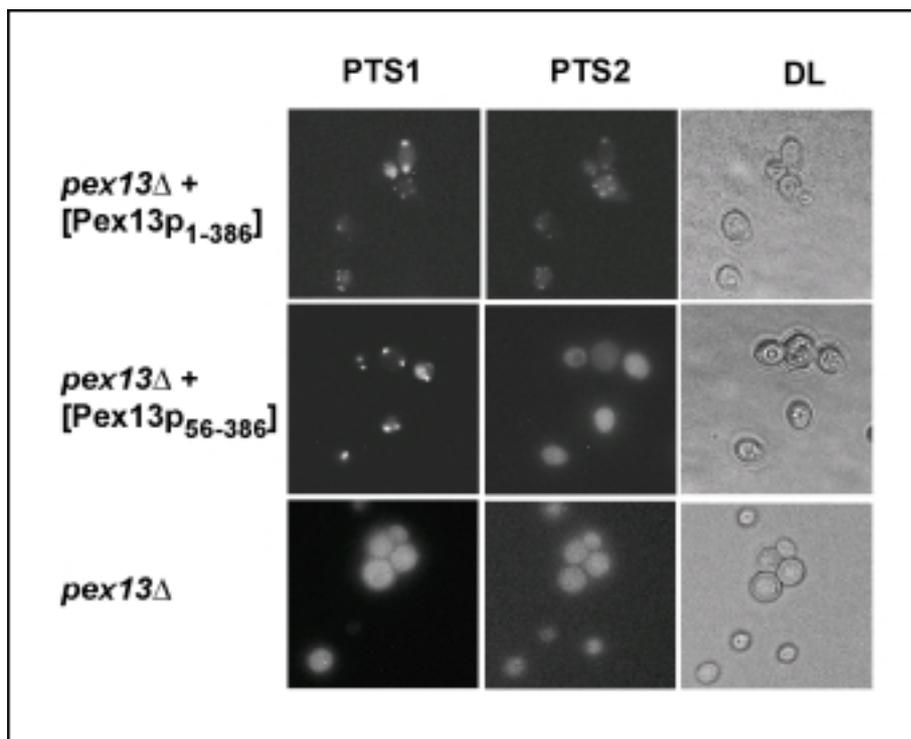


Abb. 3.18 Selektive Komplementation des PTS1-abhängigen Matrixproteinimports in Pex13p₅₆₋₃₈₆. Zellen aus UTL-7*Apex13Δ* wurden mit Pex13p₁₋₃₈₆ oder Pex13p₅₆₋₃₈₆ in Kombination mit GFP-PTS1 und PTS2-DsRed transformiert. Nach Ausstreichen der Zellen auf Ölsäureplatten erfolgte die Fluoreszenzanalyse der Markerproteine. Das Durchlicht verdeutlicht die Co-Lokalisation der Peroxisomen innerhalb der strukturell intakten Zellen.

Die Abb. 3.18 zeigt, dass die Expression des gesamten Pex13p zu einem punktierten Fluoreszenz-Muster der beiden Markerproteine GFP für den PTS1-Import und DsRed für den PTS2-Import führte (oberste Reihe). In der untersten Reihe findet sich die *pex13Δ* Mutante, bei der cytosolisches Leuchten der beiden Markerproteine als Kontrolle für die Mislokalisierung dieser PTS-Proteine diente. Eine sehr beeindruckende Beobachtung konnte mit der aminoterminalen Verkürzung von Pex13p gemacht werden: Das PTS2 Markerprotein wies hier ein diffuses Verteilungsmuster auf, wohingegen der PTS1-abhängige Proteinimport

durch die verkürzte Pex13p-Variante wieder hergestellt wurde, da das PTS1 Markerprotein ein punktiertes Leuchten aufwies (mittlere Reihe).

Diese Beobachtung machte deutlich, dass der PTS1-abhängige Proteinimport auch bei fehlendem Aminoterminus von Pex13p stattfinden konnte, während der PTS2-abhängige Matrixproteinimport in Pex13p₅₆₋₃₈₆ durch die Deletion blockiert war. Der Grund hierfür könnte darin liegen, dass durch das Fehlen der ersten 55 Aminosäuren von Pex13p die Anbindung von Pex7p an Pex13p nicht mehr erfolgen kann (vgl. Two-Hybrid Analysen, Abb. 3.6).

Innerhalb von Pex13p befinden sich also zwei unterschiedliche Bereiche für den peroxisomalen Matrixproteinimport, die SH3-Domäne als Bereich für den PTS1-abhängigen Proteinimport (Erdmann und Blobel, 1996) und der Aminoterminus Pex13p als Bereich für den PTS2-abhängigen Proteinimport.

3.3 Bindung des PTS2-Rezeptors an Pex14p

Pex14p wurde bereits aus verschiedenen Spezies kloniert, einschließlich aus dem Menschen, der Hefe und aus Pflanzen. Es konnte gezeigt werden, dass Pex14p sowohl für den PTS1-abhängigen (Albertini *et al.*, 1997; Brocard *et al.*, 1997; Fransen *et al.*, 1998; Schliebs *et al.*, 1999; Shimizu *et al.*, 1999) wie auch den PTS2-abhängigen Proteinimport (Albertini *et al.*, 1997; Brocard *et al.*, 1997; Shimizu *et al.*, 1999) notwendig ist. Aufgrund der Tatsache, dass Pex14p mit Pex5p und mit Pex7p interagieren kann, wird Pex14p eine Beteiligung am ersten Schritt der Interaktion von den löslichen Rezeptoren und der Organellenoberfläche zugeschrieben. Dieser Vorgang wird auch als das „Docking“ bezeichnet (Purdue und Lazarow, 2001a). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte nun überprüft werden, ob in Analogie zu der gezeigten direkten Interaktion von Pex7p mit Pex13p, Pex7p ebenfalls direkt an Pex14p bindet oder ob dazu Pex18p/Pex21p benötigt werden.

3.3.1 Die Interaktion zwischen Pex7p und Pex14p ist unabhängig von Pex18p/Pex21p

Pex7p geht im Two-Hybrid System sowohl mit Pex14p (Albertini *et al.*, 1997, Brocard, 1997 #306, Shimizu, 1999 #609) als auch mit den cytosolischen Proteinen Pex18p/Pex21p (Purdue *et al.*, 1998) eine starke Bindung ein. In einem nächsten Schritt sollte nun überprüft werden, ob Pex18p und Pex21p für die Bindung von Pex7p an Pex14p erforderlich sind. Um dies zu klären, wurde im Wildtyp und in der *pex18Δpex21Δ* Doppelmutante die Interaktion zwischen Pex7p und Pex14p getestet. Wenn die Interaktion zwischen Pex7p und Pex14p die

Anwesenheit von Pex18p/Pex21p erfordert, sollte die Interaktion zwischen den beiden Proteinen in der Doppeldeletionsmutante nicht mehr zu detektieren sein.

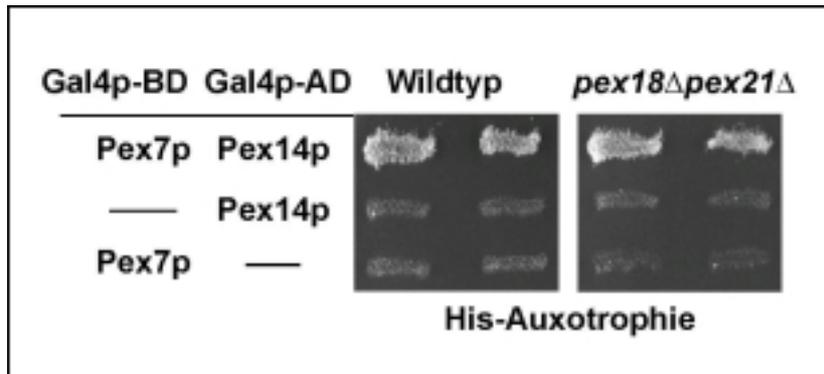


Abb. 3.19 Two-Hybrid Analyse der Interaktion von Pex7p mit Pex14p im Wildtyp und in *pex18Δpex21Δ* Zellen. Die Analyse erfolgte im HF7c Stammhintergrund. Doppeltransformanten, welche die angezeigten Fusionsproteine exprimierten, wurden zum Nachweis einer Histidin-Prototrophie auf SD-Agarplatten ohne Histidin mit 5 mM 3-Aminotriazol analysiert. Gezeigt sind jeweils 2 unabhängige Klone.

In Abb. 3.19 wird deutlich, dass die Interaktion zwischen Pex7p und Pex14p in der Doppeldeletionsmutante vergleichbar mit jener im Wildtyp war. Dies ließ darauf schließen, dass Pex18p/Pex21p für die Interaktion von Pex7p mit Pex14p nicht notwendig waren.

Dieses Ergebnis sollte anschließend durch eine Co-Immunopräzipitation bestätigt werden. Von ölsäureinduzierten Zellen des Wildtyps UTL-7A sowie den ansonsten isogenen *pex13Δ*, *pex14Δ*, *pex18Δ* und *pex18Δpex21Δ* Mutanten, welche mit dem Plasmid YEpmyc-Pex7p transformiert worden waren, wurden Zellextrakte hergestellt und myc-Pex7p immunpräzipitiert. Nach Inkubation und anschließender Waschung des Immunkomplexes wurden die gebundenen Proteine durch Aufnahme der Magnetkugeln in SDS-Probenpuffer eluiert und immunologisch analysiert. Im Gesamtzellextrakt des transformierten Wildtyps konnte Pex14p mit Pex7p präzipitiert werden (Abb. 3.20). Wie erwartet konnte Pex14p mit Pex7p auch in Abwesenheit von Pex13p (Spur 3) präzipitiert werden (Girzalsky *et al.*, 1999). Die gleiche Beobachtung konnte aber auch in *pex18Δ* und insbesondere in *pex18Δpex21Δ* gemacht werden. Die Tatsache, dass Pex7p mit Pex14p in *pex18Δpex21Δ* präzipitierbar ist, ließ darauf schließen, dass die Interaktion von Pex14p mit Pex7p unabhängig von Pex18p/Pex21p war, womit durch dieses Ergebnis die erzielten Two-Hybrid Daten verifiziert werden konnten.

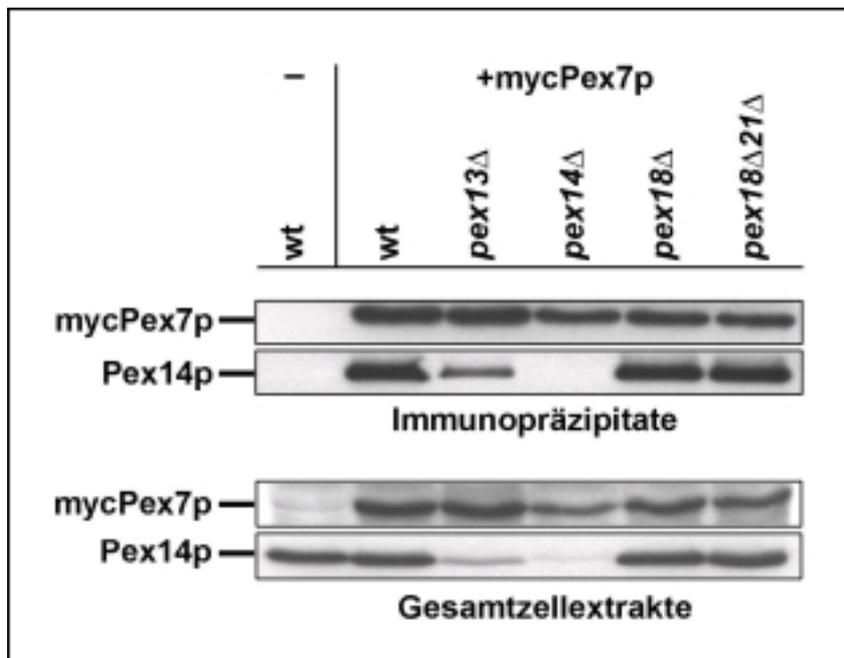


Abb. 3.20 Pex7p bindet in Abwesenheit von Pex18p und Pex21p an Pex7p. Der UTL-7A Wildtyp-Stamm, sowie die mit *myc*-Pex7p transformierten Stämme UTL-7A, *pex13* Δ , *pex14* Δ , *pex18* Δ und *pex18* Δ *pex21* Δ wurden mit Ölsäure und CuSO₄ induziert. In einer Co-Immunopräzipitation wurde die Anwesenheit von Pex14p in den Immunopräzipitaten von *myc*-Pex7p analysiert. Gleiche Volumenanteile der Präzipitate (1/10 des Ansatzes, oben) und der eingesetzten Extrakte (1/200 des Ansatzes, unten) wurden mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese getrennt und auf einer Nitrozellulose immobilisiert. Die Membranen wurden mit den angegebenen Antikörpern inkubiert und die Immunokomplexe unter Verwendung des ECL-Systems detektiert.

3.3.2 Heterologe Expression von MBP-Pex7p und His₆-Pex14p

Nun sollte in einer *in vitro* Bindungsstudie versucht werden, die *in vivo* Interaktion zwischen Pex7p und Pex14p zu zeigen. Hierzu war es erforderlich, diese beiden Proteine mit jeweils einem unterschiedlichen Tag in *E. coli* heterolog zu exprimieren. Im Falle von Pex7p wurde unter Nutzung des *E. coli* Expressionsvektors pMAL-c2 der komplette Leserahmen von Pex7p aminoterminal an das Maltose-bindende Protein (MBP) fusioniert. Für den Bindepartner Pex14p wurde ebenfalls der komplette Leserahmen in den *E. coli* Vektor pQE31 mit einem aminoterminalen 6xHis-Epitop kloniert (X.Hong, FU Berlin). Nach Transformation der Konstrukte in die expressionskompetenten *E. coli* Zellen C41 erfolgte die Analyse der Expressionsbedingungen und des Löslichkeitsverhaltens (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der Struktur von Pex7p und Pex14p hatten die exprimierten Proteine eine starke Neigung zur Ausbildung von „inclusion bodies“. Dem konnte zumindest teilweise durch sehr geringe IPTG-Konzentrationen von 0,3 mM und Induktionstemperaturen von 20°C entgegengewirkt werden. Des weiteren wurde durch Variationen des Zellaufschlusses versucht, die Löslichkeit der Proteine zu optimieren. Anhand der Analyse verschiedener Aufschlussmethoden stellte sich heraus, dass der Aufschluss dann am effektivsten verlief, wenn das ge-

waschene *E.coli* Zellpellet mind. 15 h bei -20°C gelagert wurde, das Auftauen auf Eis erfolgte und die Ultraschallbehandlung im Eiswasserbad für 6 x 45 sec mit jeweils 2 min Pause durchgeführt wurde. Nach 30 min Zentrifugation bei 12000 rpm (Sorvall, SS34) wurde der lösliche Überstand an die entsprechende Matrix gebunden, gewaschen und mit entsprechenden Elutionspuffern von der Matrix eluiert.

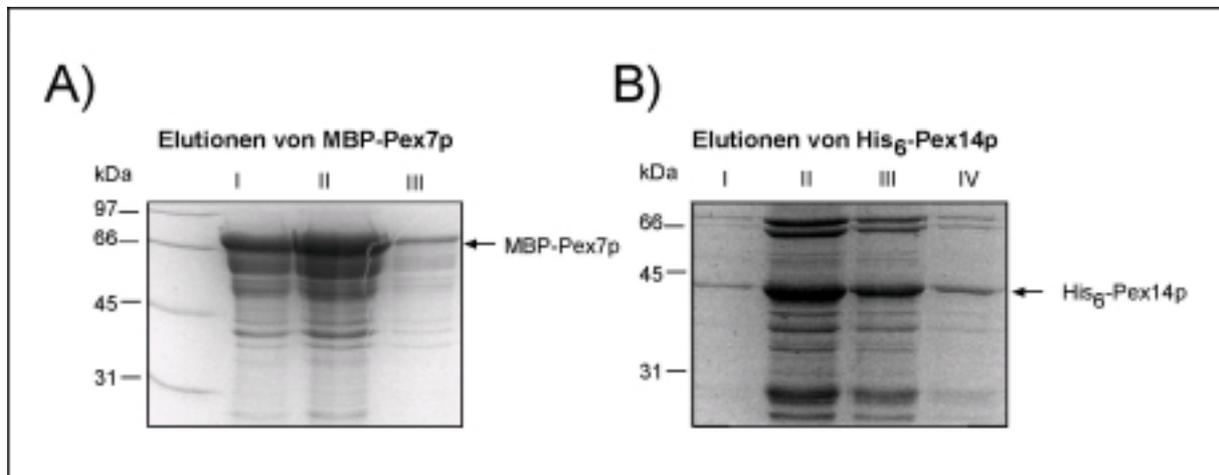


Abb. 3.21 Aufreinigung der heterolog exprimierten Proteine MBP-Pex7p und His₆-Pex14p. Gezeigt werden jeweils gleiche Mengen der schrittweise erfolgten Elutionen A) Zeigt drei zeitlich nacheinander folgende Elutionen (I-III) von MBP-Pex7p mit 10 mM Maltose. In Elution III erscheint das Protein zwar rein, jedoch nur in sehr geringer Konzentration. B) Um optimale Elutionsbedingungen für His₆-Pex14p zu erzielen, wurden unterschiedliche Imidazol-Konzentrationen gewählt, dargestellt mit E I bis E IV (von 250 mM bis 600 mM). Gezeigt werden äquivalente Mengen der unterschiedlichen Elutionen, die mit 2 x SDS-Probenpuffer versetzt auf einem 12 %igen SDS-Gel analysiert wurden.

Die Abb. 3.21 zeigt das Elutionsprofil von A) MBP-Pex7p und von B) His₆-Pex14p. Die Elution von MBP-Pex7p erfolgte in allen 3 Fällen mit 10 mM Maltose. Die Elution von His₆-Pex14p erfolgte mit I= 250 mM, II= 300 mM, III= 500 mM und IV=600 mM Imidazol, wobei mit 300 mM Imidazol das beste Elutionsergebnis erzielt wurde. Mit diesen beiden Proteinen konnte nun eine *in vitro* Bindungsstudie durchgeführt werden.

3.3.3 *Pex7p bindet in vitro an Pex14p*

Um eine *in vitro* Bindung zwischen Pex7p und Pex14p zu zeigen, erfolgte die Anzucht und der Aufschluss von MBP-Pex7p, His₆-Pex14p sowie von MBP, wie zuvor beschrieben. Für diese Bindungsstudie wurde Pex14p an eine Ni-NTA-Matrix gebunden und zwar durch Inkubation des Proteins mit der Matrix für 1 h bei 4°C auf einem Drehrad. Danach wurde mit Waschpuffer ungebundenes Pex14p entfernt. Es erfolgte die Inkubation des an die Matrix gebundenen Pex14p mit dem löslichen Anteil des MBP-Pex7p bzw. mit löslichem MBP als Negativkontrolle. Nach 1 h Inkubation bei 4°C wurde erneut ungebundenes Protein mit Waschpuffer entfernt. Die Elution erfolgte sukzessive bei 4°C mit 3 x 600 µl Elutionspuffer mit 300 mM Imidazol. Äquivalente Anteile der Eluate wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt und im SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung oder einer Detektion im Immunoblot analysiert. In Abb. 3.22 A) zeigen Spur 1 und 2 den löslichen Überstand von MBP (1) und MBP-Pex7p (2). In Spur 3 und 4 sind die His-Pex14p Eluate zu sehen, welche mit MBP-Pex7p (3) und MBP (4) inkubiert wurden. Bei ca. 42 kDa konnte eluiertes His₆-Pex14p detektiert werden. In Spur 3 ist in Höhe von ca. 86 kDa MBP-Pex7p zu sehen, während in Spur 4 MBP in Höhe von ca. 46 kDa nicht zu erkennen ist. Um das Ergebnis des Coomassie-gefärbten SDS-Gels zu bestätigen, wurde mit je 1/20 der SDS-Probe des Überstandes und der Eluate eine Immunoblot-Analyse durchgeführt (Abb. 3.22 B). Der Immunoblot wurde, um den Fusionsanteil zu detektieren, mit einem α-MBP-Antikörper inkubiert.

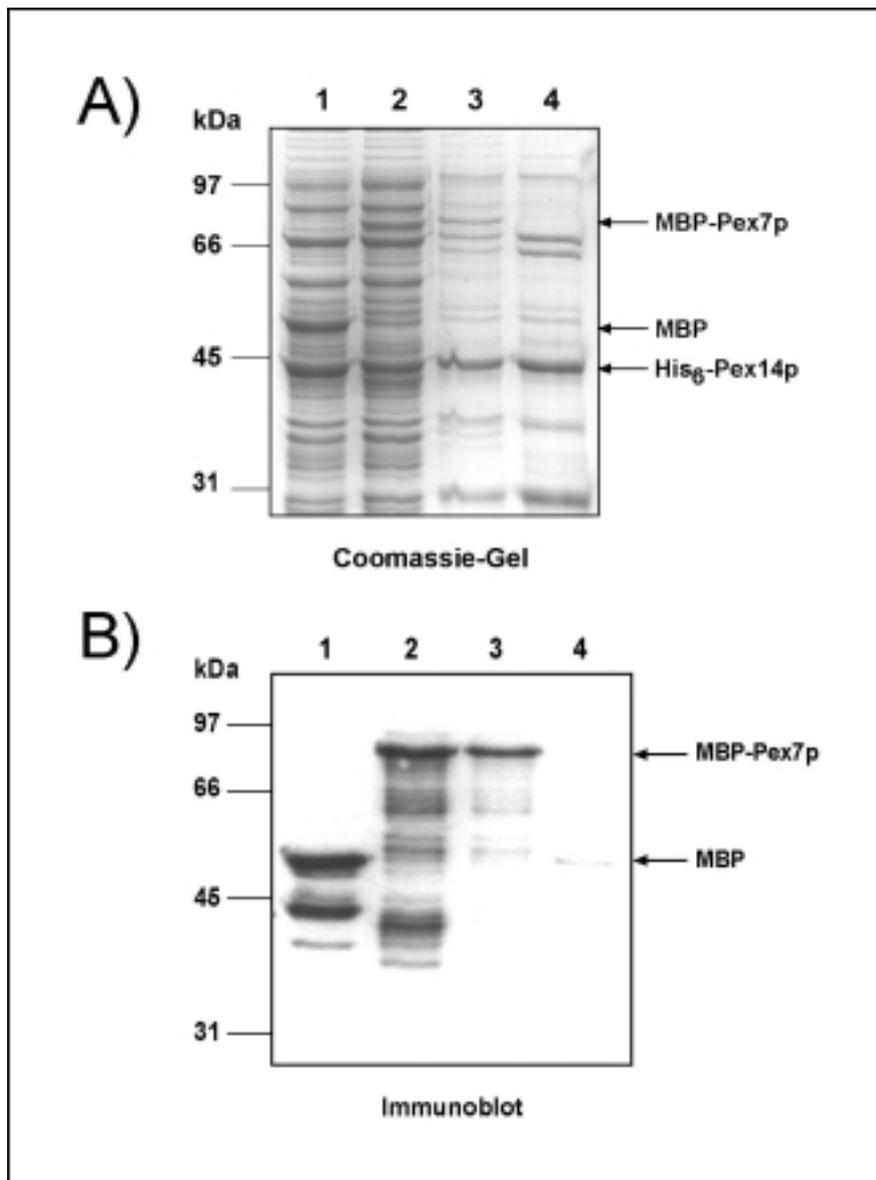


Abb. 3.22 *In vitro* Bindung von Pex14p an Pex7p. A) Entsprechende Mengen der löslichen Überstände von MBP (Spur 1) und MBP-Pex7p (Spur 2) wurden an gereinigtes His₆-Pex14p gebunden. Nach dem Waschen wurden die Eluate von His₆-Pex14p auf die Anwesenheit von gebundenem MBP-Pex7p (Spur 3) oder MBP (Spur 4) untersucht. Die Analyse erfolgte durch ein Coomassie gefärbtes SDS-Gel. B) Die gleichen Proben wurden 1:20 verdünnt, über ein SDS-Gel aufgetrennt und über einen anschließenden Immunoblot unter Einsatz eines α -MBP Antikörpers analysiert.

In der Immunoblot Analyse (Abb. 3.22, B) konnte MBP-Pex7p eindeutig in dem His₆-Pex14p Eluat nachgewiesen werden (Spur 3), im Gegensatz dazu konnten nur geringe Mengen an MBP in Spur 4 detektiert werden. Somit kann heterolog exprimiertes Pex7p spezifisch mit Pex14p interagieren. Diese Bindungsstudie zeigt somit erstmalig, dass die Bindung zwischen den beiden *S.cerevisiae* Peroxinen direkt ist.

3.4 Die Rolle von Pex18p und Pex21p im PTS2-abhängigen Proteinimport

Nachdem alle bisher getesteten Interaktionen unabhängig von Pex18p und Pex21p möglich waren, sollte nun geklärt werden, wo innerhalb des Translokationsprozesses die beiden redundanten Proteine notwendig sind. Zuerst wurde versucht, die bereits publizierten Two-Hybrid Ergebnisse von Purdue *et al.* zu reproduzieren (Purdue *et al.*, 1998). Hierzu wurde das bislang einzig bekannte PTS2-abhängige Matrixprotein β -Ketoacyl-CoA-Thiolase (Fox3p) in die beiden Two-Hybrid Vektoren kloniert. Ausgehend von dem Konstrukt Gal4p-BD-Fox3p (W.-H. Kunau, Ruhr-Universität-Bochum) wurde der offene Leserahmen von Fox3p mit *SaI* und *SacI* restringiert, in den ebenso präparierten Gal4p-AD Vektor von pPC86 einkloniert (pKat146) und für die folgenden Two-Hybrid Analysen verwendet.

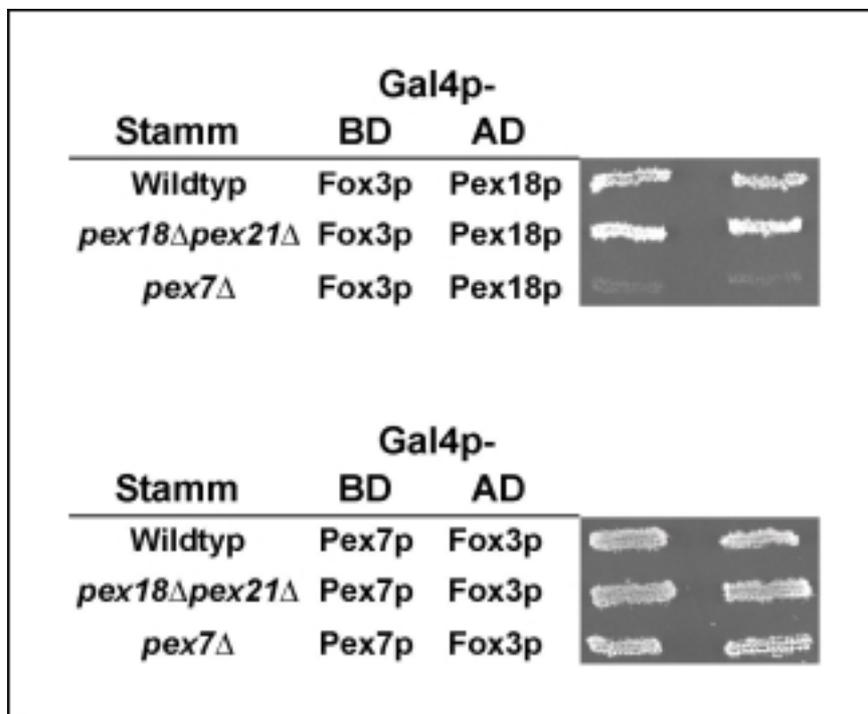


Abb. 3.23 Analyse der Fox3p- Interaktion im Hefe Two-Hybrid System. Getestet wurde die Interaktion von Fox3p mit Pex18p (oben) und Fox3p mit Pex7p (unten) im HF7c Wildtyp und in den Mutanten *pex18Δpex21Δ* und *pex7Δ*.

Im HF7c Wildtyp sowie in den Mutanten *pex7Δ* und *pex18Δpex21Δ* war, wie erwartet, eine Interaktion der Thiolase (Fox3p) mit Pex7p zu beobachten (Abb. 3.23, unteres Bild). Die Interaktion von Pex18p mit Fox3p wurde in den drei gleichen Stämmen analysiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen Fox3p und Pex18p von der Anwesenheit von Pex7p abhängig war (Abb. 3.23, oberes Bild). Die Interaktion zwischen Pex21p und der Thiolase wurde ebenfalls beobachtet (Daten nicht gezeigt). Die in dieser

Two-Hybrid Studie gewonnenen Daten stimmen mit den von Purdue publizierten Ergebnissen überein und machen deutlich, dass einzig und allein Pex7p die PTS2-Signalsequenz erkennt, wobei Pex18p, um Fox3p zu kontaktieren, von der Anwesenheit von Pex7p abhängig ist.

3.4.1 Pex7p bindet direkt an PTS2

In einer weiteren *in vitro* Bindungsstudie sollte gezeigt werden, dass Pex7p in der Lage ist, ein synthetisches PTS2 unabhängig von Pex18p/Pex21p zu erkennen. Hierzu erfolgte die Anzucht und der Aufschluss von heterolog exprimiertem MBP-Pex7p, GST und von einem synthetischen GST-PTS2 (R. Bahadori, FU Berlin). Für diese Bindungsstudie wurden die löslichen Zellextrakte von MBP-Pex7p an eine Amylose-Matrix gebunden und anschliessend mit Zellextrakten von GST bzw. GST-PTS2 inkubiert. Nach intensiver Waschung, um unspezifische Bindungen zu vermindern, erfolgte die Elution der Matrix mit 10 mM reduziertem Gluthation. Es wurden äquivalente Anteile der Eluate in einem Immunoblot analysiert. Um den Fusionsanteil zu detektieren, erfolgte die Inkubation mit einem α -GST Antikörper.

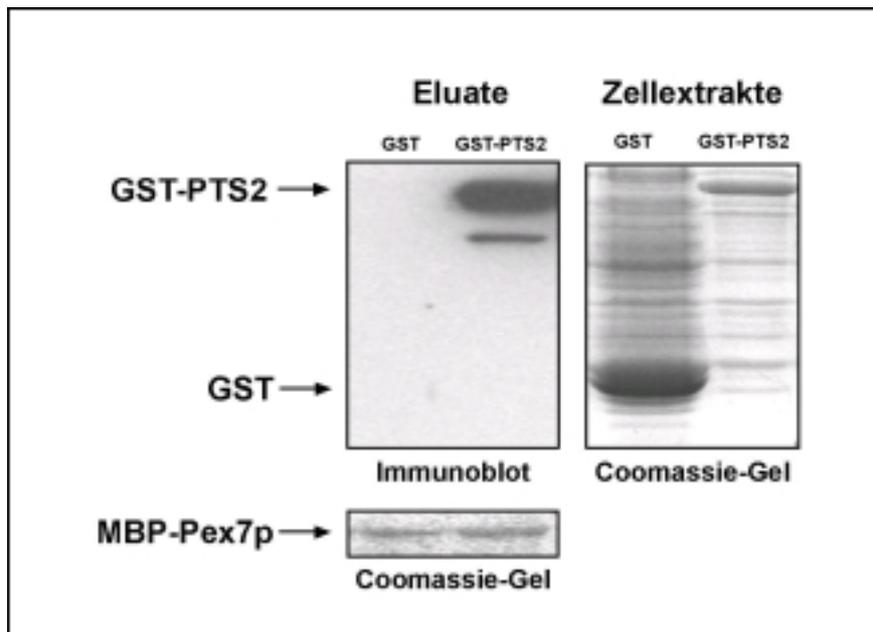


Abb. 3.24 Pex7p bindet *in vitro* ein synthetisches PTS2-Protein. Äquivalente Anteile von MBP-Pex7p wurden an eine Matrix gebunden und mit dem löslichen Überstand von bakteriell exprimiertem GST-PTS2-GFP-prA (GST-PTS2) oder mit GST inkubiert. Das Coomassie Gel rechts zeigt die Zellextrakte, die auf die Matrix gegeben wurden. Die Bindung der GST-enthaltenen Proteine nach Elution von MBP-Pex7p wurde in einem Immunoblot mit α -GST-Antikörper analysiert. Das untere Gel zeigt die Anwesenheit von MBP-Pex7p in beiden Eluaten in einem Coomassie gefärbten Gel.

In Abb. 3.24 wird das Ergebnis einer *in vitro* Bindungsstudie mit heterolog exprimiertem Pex7p und GST-PTS2 dargestellt. Dabei zeigen Spur 1 und 2 die MBP-Pex7p Eluate, welche mit GST bzw. PTS2-GST inkubiert wurden. In der 2. Spur konnte PTS2 in der entsprechenden Höhe detektiert werden, hingegen erfolgt in Spur 1 keine Detektion von GST. Somit erfolgte die Bindung von GST-PTS2 spezifisch an Pex7p. Um die Anwesenheit von MBP-Pex7p in den Eluaten zu bestätigen, wurde ein entsprechender Anteil mit SDS-Probenpuffer versetzt und in einem Immunoblot, welcher mit einem α -MBP Antikörper inkubiert wurde, analysiert. In beiden Proben kann MBP-Pex7p detektiert werden (Abb. 3.24, unteres Bild). Das rechte Bild (Abb. 3.24) zeigt die löslichen Zellextrakte von GST und GST-PTS2 in einem Coomassie gefärbten Gel. In der linken Spur kann GST in Höhe von ca. 28 kDa und in der rechten Spur kann GST-PTS2 in Höhe von ca. 66 kDa detektiert werden. Anhand dieser Bindungsstudie konnte gezeigt werden, dass Pex7p alleine ausreichend ist, um PTS2 zu erkennen und zu binden.

3.4.2 Thiolase interagiert mit Pex14p in Abhängigkeit von Pex7p, Pex18p und Pex21p

Als nächstes sollte die Frage geklärt werden, ob Thiolase in der Lage ist mit den Komponenten der peroxisomalen Dockingmaschinerie einen Komplex zu bilden und ob dieser Komplex auch in Abwesenheit von Pex7p oder Pex18p/Pex21p zustande kommen kann. Zur Lösung dieser Fragestellung wurden weitere Two-Hybrid Experimente durchgeführt. Untersucht wurde die Interaktion von Fox3p mit Pex14p und von Fox3p mit Pex13p in Abhängigkeit von Pex7p bzw. Pex18p/Pex21p. Die Ergebnisse werden in der folgenden Abb. 3.25 zusammengefasst.

Im Wildtyp konnte bereits nach 2 Tagen eine Interaktion zwischen Pex14p und Fox3p beobachtet werden, hingegen wurde in den Mutanten *pex7 Δ* und *pex18 Δ pex21 Δ* keine Interaktion zwischen diesen beiden Proteinen detektiert (Abb. 3.25, oben). Für die Analyse der Interaktion mit Pex13p wurde das Konstrukt Pex13p₁₋₁₀₀, welches in der Lage ist, mit Pex7p, Pex18p und Pex21p zu interagieren, verwendet. In einer Two-Hybrid Analyse mit Fox3p und Pex13p konnte weder im Wildtyp noch in der *pex18 Δ pex21 Δ* Doppelmutante eine Interaktion detektiert werden. In *pex14 Δ* , wo die Interaktion zwischen Pex7p und Pex13p₁₋₁₀₀ deutlicher zu detektieren ist als im Wildtyp, wurde ebenfalls keine Interaktion zwischen den Pex13p und Fox3p beobachtet (Abb. 3.25, unten).

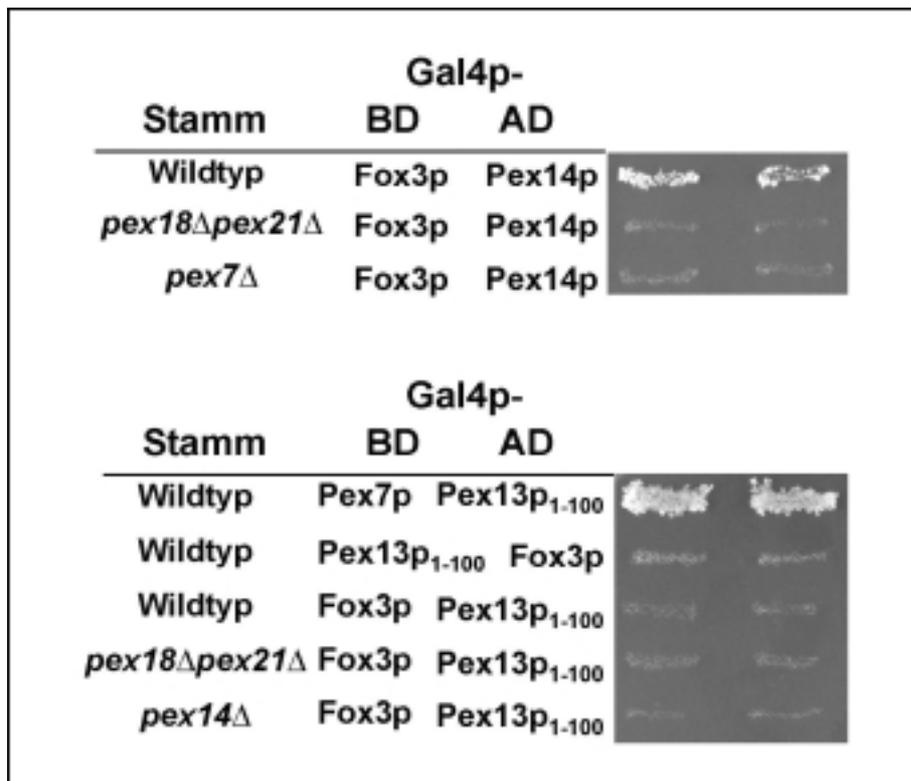


Abb. 3.25 Fox3p interagiert im Hefe Two-Hybrid System mit Pex14p in Abhängigkeit von Pex7p und Pex18p/Pex21p. Getestet wurde die Interaktion von Fox3p mit den beiden Docking Proteinen Pex14p (oben) im HF7c Wildtyp, in *pex18Δpex21Δ* und *pex7Δ*. Die untere Abbildung zeigt die Analyse von Pex13p₁₋₁₀₀ mit Fox3p im HF7c Wildtyp, in *pex18Δpex21Δ* und in *pex14Δ*.

Die Zusammenfassung dieser Two-Hybrid Daten ließ den Schluss zu, dass das Andocken der PTS2 Cargo-Proteine sowohl von Pex18p/Pex21p wie auch von Pex7p abhängig ist. Des Weiteren besteht die Annahme, dass Pex14p die Rolle des initialen Docking-Proteins zukommt. Die Bedeutung von Pex13p könnte hierbei eher in der Formierung eines Pex7p-Pex18p/Pex21p-Komplexes, der nicht mit Cargo-Protein beladen ist, liegen.

3.4.3 *Pex18p* und *Pex21p* sind an der Bildung eines Import-kompetenten PTS2-Substrat-Komplexes beteiligt

In früheren Arbeiten wurde bereits gezeigt, dass im Vergleich zum Wildtyp in Abwesenheit von Komponenten der peroxisomalen Importmaschinerie beachtliche Mengen an Thiolase mit Pex7p präzipitiert werden konnten. Diese gesteigerte Bindung von Fox3p an Pex7p wurde als cytosolische Akkumulation als Folge des Nichtimports von Fox3p interpretiert (Albertini *et al.*, 1997; Girzalsky *et al.*, 1999). Es stellt sich nun die Frage, ob die Funktion von Pex18p und Pex21p darin besteht, dass sie das Andocken des Pex7p-Fox3p-Komplexes an Pex14p vermitteln. Wenn dies der Fall ist, dann sollte auch in der Doppelmutante *pex18Δpex21Δ* der Cargo-geladene Rezeptor akkumulieren. Zur Klärung dieser Hypothese

wurde *myc-Pex7p* in UTL-7A und den isogenen Stämmen *pex13Δ*, *pex14Δ*, *pex18Δ* und *pex18Δpex21Δ* exprimiert und eine Co-Immunopräzipitation wie zuvor beschrieben durchgeführt.

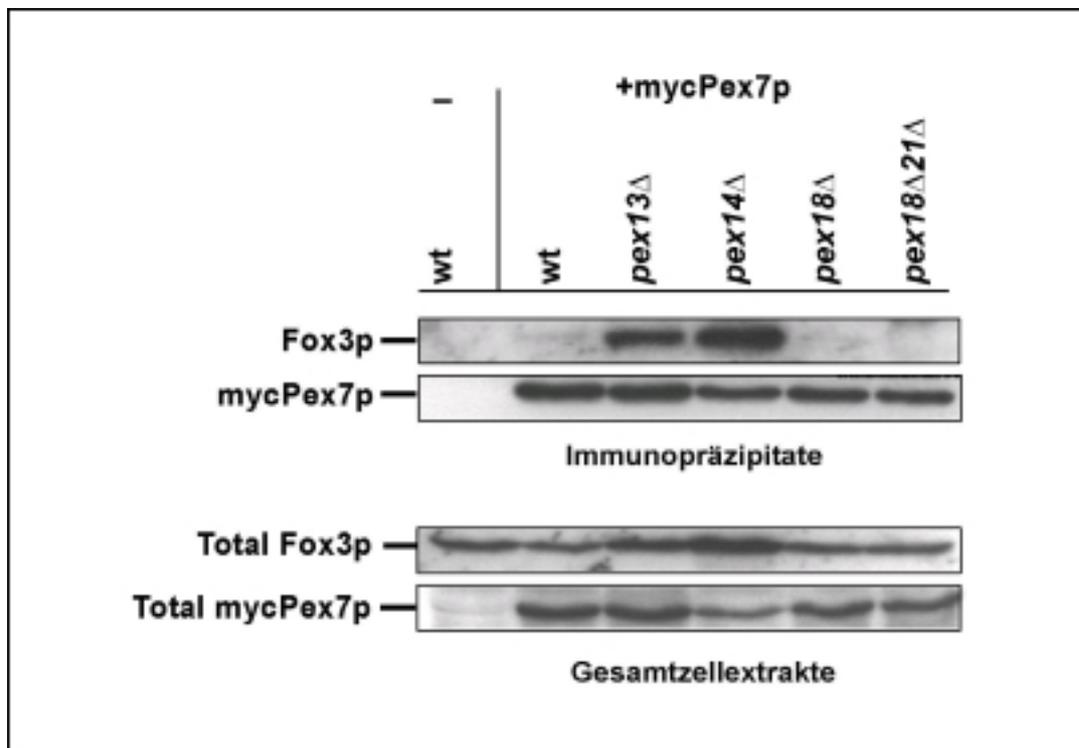


Abb. 3.26 In der *pex18Δpex21Δ* Doppelmutante ist keine Akkumulation von Fox3p mit *myc-Pex7p* zu beobachten. *Myc-Pex7p* wurde aus Gesamtzellextrakten des Wildtyps UTL-7A, sowie der Mutanten *pex13Δ*, *pex14Δ*, *pex18Δ* und *pex18Δpex21Δ* immunpräzipitiert. Gleiche Volumenanteile der Präzipitate (1/10 des Ansatzes, oben) und der eingesetzten Extrakte (1/200 des Ansatzes, unten) wurden mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese getrennt und auf einer Nitrozellulose immobilisiert. Die Membranen wurden mit α -Fox3p und α -*myc*-Antikörpern inkubiert und die Immunokomplexe unter Verwendung des ECL-Systems detektiert.

In den Präzipitaten, gewonnen aus *pex13Δ* und in *pex14Δ* Zellen, war wie erwartet, eine deutliche Fox3p-Bande in Höhe von ca. 42 kDa mit dem α -Thiolase-Antikörper zu detektieren, diese war im Wildtyp sehr dünn. Jedoch konnte in *pex18Δpex21Δ* Zellen ebenso nur eine schwache Bande detektiert werden. Die Mengen an präzipitiertem *myc-Pex7p* in den transformierten Stämmen waren relativ ähnlich, wie durch den Einsatz des α -*myc*-Antikörpers verdeutlicht werden konnte.

Da der *myc-Pex7p*-Fox3p-Komplex in *pex18Δpex21Δ* Stämmen nur in geringer Menge detektiert werden konnte, sollte die Möglichkeit überprüft werden, ob durch die Überexpression von Pex7p der Importdefekt der Doppelmutante supprimiert wurde. Dazu wurden die Transformanten einem Wachstumstest auf Ölsäureplatten unterzogen.

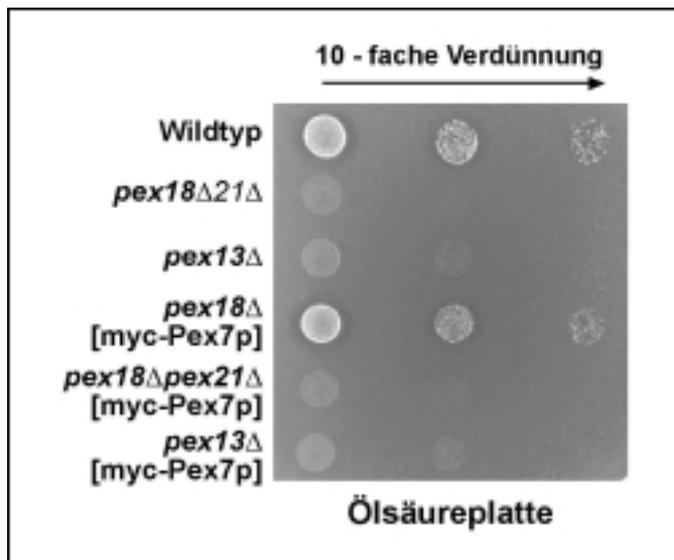


Abb. 3.27 Effekt des überexprimierten *myc-Pex7p* in der Doppelmutante *pex18Δpex21Δ*. Jeweils 3 verschiedene Verdünnungsstufen der angegebenen Stämme wurden auf Ölsäureplatte getüpfelt und diese für 5 Tage bei 30°C inkubiert.

Der Wildtyp und die *pex18Δ* Mutante zeigten nach 5 Tagen deutliches Wachstum sowie die charakteristische Hofbildung auf dem Ölsäuremedium (Abb. 3.27). Andererseits waren weder die *pex18Δpex21Δ* Doppelmutante noch *pex18Δpex21Δ [mycPex7p]* dazu befähigt, auf Ölsäure zu wachsen.

Somit muss die Tatsache, dass in *pex18Δpex21Δ* Stämmen Thiolase kaum mit *myc-Pex7p* präzipitiert werden konnte, eine im folgenden aufzuklärende Ursache haben.

Eine Möglichkeit wäre, dass die beiden Peroxine Pex18p/Pex21p in einem Schritt, der vor dem Andocken von Pex7p an die peroxisomale Membran passiert, eine entscheidende Rolle innehaben. Wenn dies der Fall sein sollte, dann sollte die zuvor beobachtete Akkumulation an Fox3p-Pex7p in der *pex14Δ* Mutante durch das zusätzliche Deletieren von Pex18p/Pex21p auf das Niveau der Doppelmutante zurückgehen.

3.4.3.1 Herstellung einer Dreifach-Deletion: *UTL-7Apex14Δpex18Δpex21Δ*

Es galt also, diesen Effekt in einer Dreifach-Deletionsmutante *UTL-7Apex18Δpex21Δpex14Δ* zu analysieren. Um diese Mutante zu erstellen, wurde von dem bereits existierendem Stamm *UTL-7Apex14Δ* die auf dem *LEU2*-Gen basierende Deletionskassette mit dem Primerpaar RE 87/88 aus genomischer DNA amplifiziert und über homologe Rekombination in die Doppelmutante *pex18Δpex21Δ* integriert (siehe Materialien und Methoden, 2.13). Der Austausch von *PEX14* durch *LEU2* wurde über ölunduzierte Zellen, von denen ein Gesamtzell-extrakt hergestellt wurde, analysiert. In einer erfolgreichen Dreifach-Deletion darf unter Einsatz des α -Pex14p-Antikörpers keine Pex14p-Bande mehr zu detektieren sein.

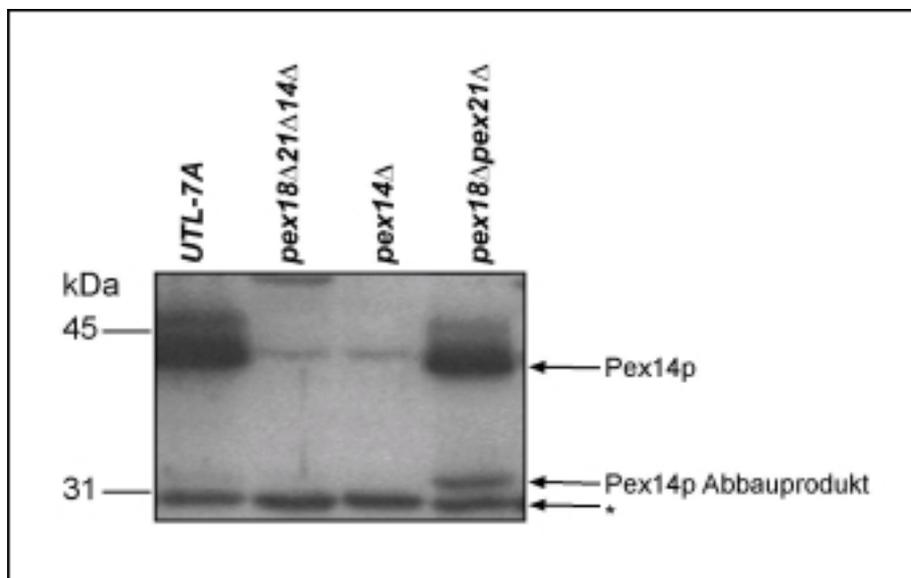


Abb. 3.28 Analyse der Dreifach-Deletion. Die Analyse der eingeführten *PEX14* Deletion erfolgte in *pex18Δpex21Δ*-Zellen immunologisch über Gesamtzellextrakte mit einem α -Pex14p-Antikörper. Als Kontrollen dienen der Wildtyp, die Mutante *pex14Δ* und *pex18Δpex21Δ*. Bei ca. 30 kDa wird in allen Extrakten eine unspezifische Bande (*) detektiert.

Die im Immunoblot überprüfte Deletante erfüllte dieses Kriterium (siehe Abb. 3.28, Spur 2) und wurde im folgenden für die weiteren Analysen verwendet. In einem nächsten Schritt wurde diese Dreifach-Deletion mit *myc*-Pex7p transformiert und für die Co-Immunopräzipitation eingesetzt.

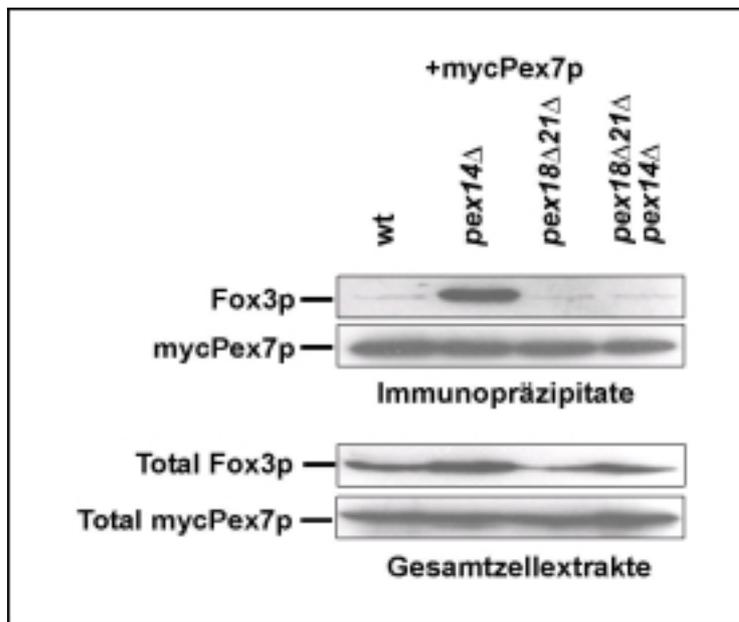


Abb. 3.29 Der *myc*-Pex7p-Fox3p Komplex akkumuliert nicht in einer *pex14Δpex18Δpex21Δ* Mutante. Gesamtzell-extrakte des Wildtyps UTL-7A, sowie der Mutanten *pex14Δ*, *pex18Δpex21Δ* und *pex18Δpex21Δpex14Δ*, die *myc*-Pex7p exprimierten, wurden einer Immunopräzipitation mit α -*myc*-Antikörpern unterzogen. Die Mengen an mitisolierendem Fox3p sind im oberen Abschnitt zu sehen.

In der Dreifach-Deletion *pex14Δpex18Δpex21Δ* wurde die Menge an Co-immunopräzipitiertem Fox3p verglichen mit der aus *pex14Δ*, *pex18Δpex21Δ*, sowie Zellen des Wildtyps UTL-7A. Dabei war zu beobachten, dass in der Dreifach-Deletion Fox3p tatsächlich nicht akkumulierte. Dieses Ergebnis ließ darauf schließen, dass der akkumulierte Pex7p-Fox3p Komplex in einer *pex14Δ* Mutante von der Anwesenheit von Pex18p/Pex21p abhängig ist. Die Ursache dieser Abhängigkeit könnte sein, dass die Funktion von Pex18p und Pex21p bereits vor dem Andocken des Fox3p-Pex7p-Pex18p/Pex21p Komplexes an Pex14p gebraucht wird.

3.4.4 Struktur und Bindestelle des PTS2-Rezeptors

Der PTS2-Rezeptor Pex7p wurde 1994 aus *S.cerevisiae* kloniert (Marzioch *et al.*, 1994; Zhang und Lazarow, 1995). Das ca. 42 kDa große Protein besitzt keine Transmembrandomänen, enthält allerdings 6 WD 40 Motive, die in Analogie zu anderen Vertretern auch als β -Transducin Wiederholungen bezeichnet werden. Durch Zhang und Lazarow wurde gezeigt, dass Pex7p innerhalb der ersten 56 Aminosäuren ein PTS besitzt (Zhang und Lazarow, 1996). Da dieser Bereich noch kein WD 40 Motiv aufweist, gehen die Autoren davon aus, dass diese ersten 56 Aminosäuren ausreichend sind, um Pex7p an das Peroxisom zu dirigieren. Es wäre daher durchaus denkbar, dass dieser Bereich von Pex7p für zumindest eine der in dieser Arbeit gezeigten Bindung an Pex14p, Pex13p oder Pex18p/Pex21p

notwendig ist. Deshalb wurden zwei Deletionskonstrukte erstellt, die in Two-Hybrid System getestet werden sollte. Ein Konstrukt enthielt die Aminosäuren 1-56 von Pex7p, das andere den Bereich von Aminosäure 56-376. Die erhaltenen Konstrukte wurden zusammen mit Pex18p, Pex14p und Pex13p₁₋₁₀₀ in den Two-Hybrid Reporterstamm HF7c transformiert, um zu analysieren, mit welchen der bekannten Interaktionspartnern die deletierte Form von Pex7p noch in der Lage ist, zu interagieren. In einem Vortest wurde die Autoaktivierung der neu erstellten Konstrukte ausgeschlossen (Daten nicht gezeigt).

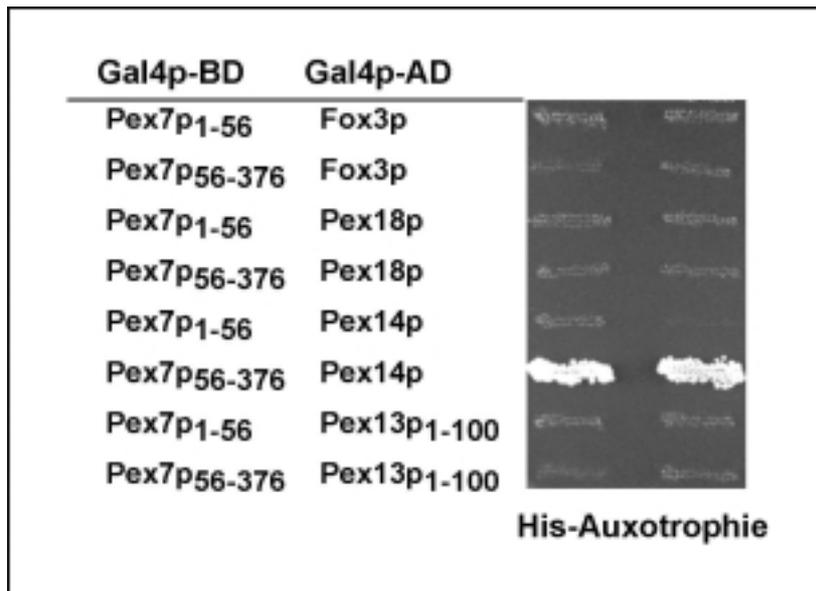


Abb. 3.30 Die Analyse der angezeigten Doppeltransformanten erfolgte im Wildtypstamm HF7c. Zum Nachweis einer Histidin-Prototrophie wurden die Stämme auf SD-Agarplatten ohne Histidin, Leucin und Tryptophan mit 5 mM 3-Aminotriazol getestet. Gezeigt werden jeweils 2 unabhängige Transformanten.

Abb. 3.30 zeigt das Ergebnis dieser Two-Hybrid Studie. Einzig das aminoterminal deletierte Konstrukt Pex7p₅₆₋₃₇₆ ist in der Lage mit Pex14p zu interagieren. Mit den anderen bekannten Interaktionspartnern von Pex7p findet mit den verkürzten Formen von Pex7p keine Interaktion statt. Dieses Ergebnis ist mit den von Zhang und Lazarow (1996) publizierten Daten schwer in Einklang zu bringen. Es könnte allerdings sein, dass für die Funktion der N-terminus völlig frei vorliegen muss. Um nun zu zeigen, dass die hier gefundene Interaktion direkt abläuft, und um genauere Aussagen für das Bindemotiv innerhalb von Pex7p treffen zu können, sind auf jeden Fall weitere Analysen erforderlich.

3.5 Bindung von Pex13p an Pex14p

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, wie das integrale Dockingprotein Pex13p und das an der peroxisomalen Membran assoziierte Pex14p im peroxisomalen Dockingkom-

plex miteinander verbunden sind. Eine Interaktion zwischen Pex13p und Pex14p wurde bereits 1997 gezeigt (Albertini *et al.*, 1997). Es handelt sich dabei um eine Interaktion zwischen der SH3-Domäne von Pex13p (Aminosäure 308-369) und dem prolinreichen Motiv von Pex14p, welches sich im N-terminalen Bereich von Pex14p befindet (Albertini *et al.*, 1997). Bei einem ersten Test der bereits zuvor beschriebenen N- und C-terminalen Verkürzungen von Pex13p konnte außerdem eine - wenn auch etwas schwächere - Interaktion mit einigen C-terminal deletierten Konstrukten gefunden werden. Die Ergebnisse dieser Studie sind in der nachfolgenden Abbildung schematisch dargestellt.

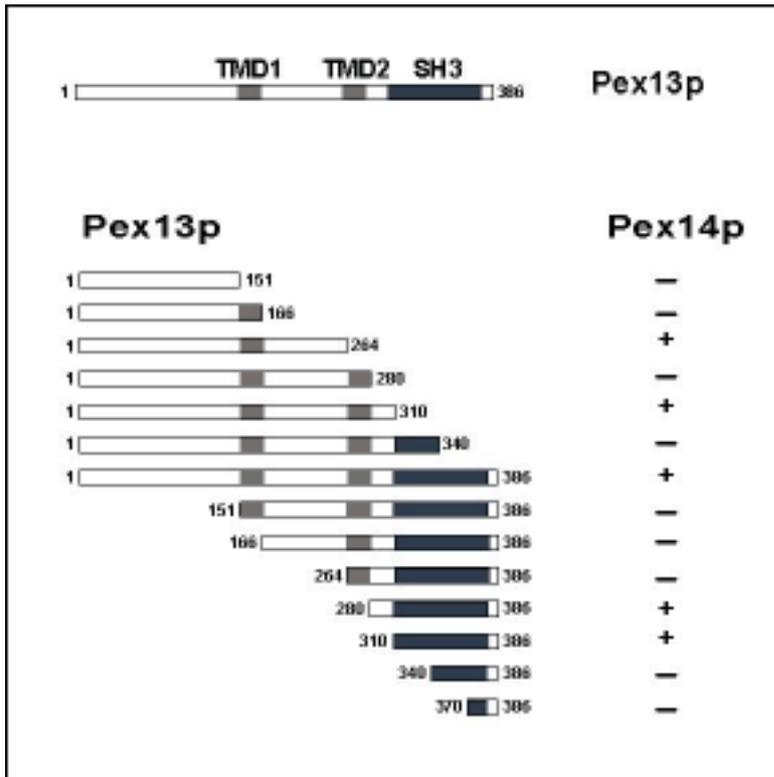


Abb. 3.31 Analyse der Interaktion zwischen dem gesamten Pex14p und N- und C-terminal verkürztem Pex13p im Two-Hybrid System. Die Analyse erfolgte im Wildtypstamm HF7c. Die Pex13p-Verkürzungen wurden in Gal4p-BD und das gesamte Pex14p wurde in Gal4p-AD exprimiert. His-Prototrophe Doppeltransformanten sind mit + gekennzeichnet.

Es zeichnete sich bereits hier ab, dass Pex14p anscheinend in der Lage ist, zusätzlich zur SH3-Domäne an einen weiteren Bereich von Pex13p zu binden, wie dies bei dem Konstrukt Pex13p₁₋₂₆₄ ersichtlich ist. Nachdem die ersten 151 Aminosäuren von Pex13p nicht mit Pex14p interagierten und somit dieser Bereich für die Bindung nicht notwendig war, wurden solche Bereiche von Pex13p zur Analyse in Two-Hybrid Vektoren kloniert, die weder die SH3-Domäne noch den Aminoterminus enthielten. In einer ersten Serie sollte auch der Einfluss der putativen Transmembrandomänen von Pex13p auf die Pex14p-Interaktion untersucht werden. Die Konstrukte wurden hierzu jeweils mit oder ohne Transmembrandomäne erstellt, es handelte sich hierbei um sogenannte „Loop-Bereiche“. Die vorliegenden Trans-

membrandomänen in Pex13p könnten nämlich der Grund dafür sein, dass beispielsweise das Konstrukt Pex13p₁₋₂₆₄, nicht jedoch das Konstrukt Pex13p₁₋₂₈₀, mit Pex14p interagieren konnte.

Pex13p Aminosäurebereich	Anzahl TMD	Bezeichnung in pPC 97
151-264	1	pKat129
151-280	2	pKat123
166-264	0	pKat127

Tab. 1 Erstellung von Verkürzungskonstrukten von Pex13p. Sich teilweise überlappende Aminosäurebereiche von Pex13p wurden in den Two-Hybrid Vektor pPC97 (Gal4p-BD) kloniert.

Mit diesen Pex13p-Verkürzungen erfolgte im Two-Hybrid Wildtyp-Stamm HF7c eine Doppeltransformation zusammen mit pPC86-Pex14p (Gal4p-AD). Die Wachstumsanalyse erfolgte wie bereits beschrieben.

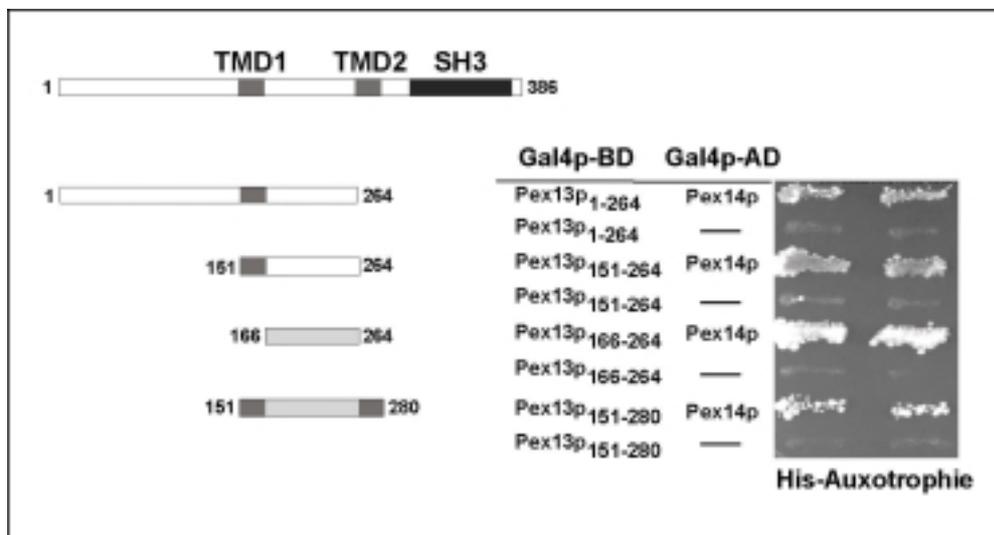


Abb. 3.32 Analyse der Interaktionen zwischen dem gesamten Pex14p und den neu erstellten Loop-Bereichen von Pex13p. Die Analyse erfolgte im Wildtypstamm HF7c. Doppeltransformanten mit der Expression der angezeigten Fusionsproteine wurden auf SD-Agarplatten ohne Leucin und Tryptophan selektiert und zum Nachweis einer Histidin-Prototrophie auf SD-Agarplatten ohne Histidin, Leucin und Tryptophan mit 5 mM 3-Aminotriazol replikplattiert. Gezeigt werden jeweils 2 unabhängige Klone.

Die Abbildung zeigt die Interaktion zwischen dem N- und C-terminal deletierten Pex13p mit Pex14p. Alle getesteten Konstrukte waren befähigt, mit Pex14p zu interagieren. Pex13p₁₆₆₋₂₆₄ schien dabei die stärkste Interaktion einzugehen, womit sich dieser Bereich als potentielle zweite Bindestelle ergab. Die flankierenden Transmembrandomänen wurden nicht für die Interaktion mit Pex14p benötigt.

3.5.1 Zweite Bindungsstelle in Pex13p für Pex14p

Durch eine in Pex14p eingeführte Mutation im Bereich des prolinhaltigen Motivs (P_{87XX}P₉₀ zu A_{87XX}A₉₀) kann die Interaktion mit der SH3-Domäne von Pex13p nicht mehr stattfinden (Girzalsky *et al.*, 1999). Dieses mutierte Konstrukt wurde nun in einer Two-Hybrid Studie eingesetzt, um zu überprüfen, ob die mit dem Loop-Bereich von Pex13p gefundene Interaktion mit Pex14p durch diese Mutation beeinflusst wird (Abb. 3.33). Die Doppeltransformation von Pex13p₂₈₀₋₃₈₆ galt hierbei als Positivkontrolle, da dieser Bereich die SH3-Domäne repräsentiert und somit nicht mehr in der Lage sein sollte, mit Pex14p-AXXA zu interagieren. Weiterhin wurde in diesem Ansatz überprüft, ob die beschriebene Dimerisierung (Albertini *et al.*, 1997; Brocard *et al.*, 1997) durch die eingefügten Punktmutationen verhindert wird oder ob diese davon unberührt bleibt.

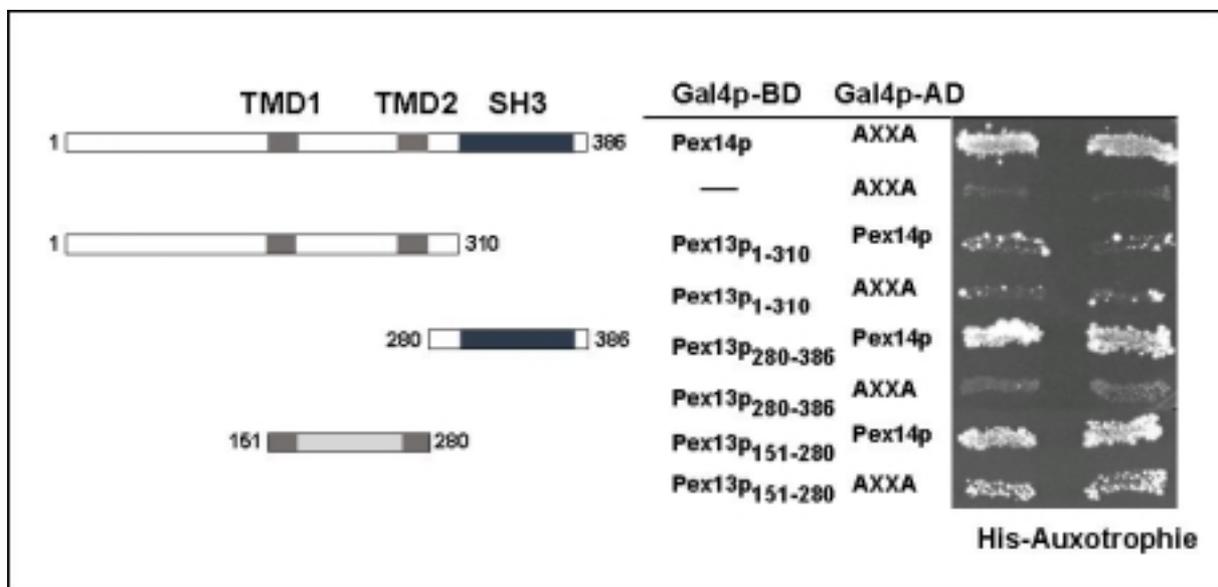


Abb. 3.33 Analyse der Interaktion zwischen Pex14p und Pex14p-AXXA mit Verkürzungen von Pex13p. Dargestellt sind zwei unabhängige Klone der Doppeltransformationen jeweils mit dem unveränderten Pex14p und mit dem punktmutierten Pex14p, bezeichnet als AXXA.

Der Pex13p₁₅₁₋₂₈₀-Loop interagiert sowohl mit Pex14p, wie auch mit Pex14p-AXXA. Dieses Ergebnis legte die Vermutung nahe, dass für diese zweite Bindestelle innerhalb von Pex13p das prolinreiche Motiv von Pex14p nicht benötigt wurde. Weiterhin konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass die Dimerisierung von Pex14p unabhängig vom prolinreichen Motiv erfolgen kann. Als nächstes galt zu klären, ob die neu gefundene Interaktion zwischen Pex13p und Pex14p direkt ist oder ob sie über ein weiteres Protein abläuft. Um dieser Frage nachzugehen, wurde versucht, den im Two-Hybrid System gefundenen minimalen Bereich mit den Aminosäuren 166-264 von Pex13p in *E.coli* heterolog zu exprimieren. Da ein Konstrukt, welches Pex13p₁₆₆₋₂₆₄ als GST-Fusion darstellte zwar induzierbar war, jedoch

nicht in ausreichender Menge exprimiert werden konnte (Daten nicht gezeigt), wurde zur Klärung dieser Frage eine *in vitro* Bindungsstudie mittels einer Peptid-Bibliothek durchgeführt.

3.5.2 *In vitro* Analyse der Pex14p Bindung an eine Pex13p Peptid-Bibliothek

Hierzu wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Schneider-Mergener, Charité, HU Berlin, eine an Zellulose gebundene Peptid-Bibliothek von Pex13p erstellt. Als Membran diente eine 2,5 x 7 cm große Whatman 540-Membran. Auf der Membran befanden sich 184 Spots, die den gesamten offenen Leserahmen von Pex13p repräsentierten. Der erste Spot repräsentierte Aminosäure 1-20 von Pex13p, der zweite Spot die Aminosäure 2-22, der dritte Spot Aminosäure 4-24 usw. Die Peptidsynthese erfolgt nach einer von Kramer *et al.* etablierten Methode (Kramer, 1994).

Für den Bindetest wurde die Membran durch einen Methanol-Waschschritt aktiviert und mit TBS-Puffer äquilibriert. Nachfolgend wurden unbesetzte Bindungsstellen der Membran mit Blocking-Puffer abgesättigt. Nach einem Waschschritt mit T-TBS erfolgte eine über Nacht Inkubation bei 4°C mit dem gereinigten His₆-Pex14p-Fusionsprotein (siehe 3.3.2) in einer Konzentration von 10 µg/ml. Nach einem weiteren Waschschritt erfolgte die Inkubation mit dem α-HIS-Antikörper für zwei Stunden bei Raumtemperatur. Nach mehreren Waschschritten erfolgte dann die Inkubation der Membran mit dem sekundären Antikörper. Die anschließende Detektion der Spots erfolgte im Lumi-Imager™ und die Auswertung durch den LumiAnalyst 3.0 der Firma Boehringer, Mannheim.

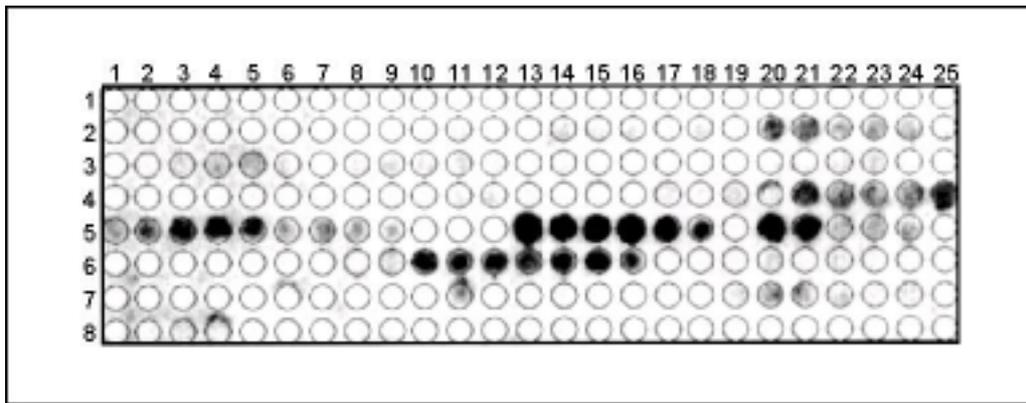


Abb. 3.34 Immunologische Detektion von His₆-Pex14p, welches an Pex13p-Peptide bindet. Eine Membran, die den gesamten offenen Leserahmen von Pex13p in Form von 20er Peptiden repräsentiert, wurde mit gereinigtem His₆-Pex14p inkubiert. Die Detektion von gebundenem His₆-Pex14p erfolgte mit einem monoklonalen α -HIS-Antikörper und dem ECL-Reaktionssystem.

Die Abb. 3.34 zeigt das Ergebnis des *in vitro* Bindungsversuches. Die markierten Spots wurden, wie in der nachfolgenden Tabelle ersichtlich, den entsprechenden Aminosäuren von Pex13p zugeordnet.

Peptid-Spot	überlappender Pex13p-Aminosäurebereich	Spotintensität [r/l]
45-46	91-108	31080
103-105	209-224	40960
113-117	233-244	201313
120-121	241-258	87678
135-141	281-288	48326

Tab. 2 His₆-Pex14p bindet an unterschiedliche Aminosäurebereiche von Pex13p

Besonders auffällig war der Spotbereich 113-117, welcher die Aminosäuren 233-244 repräsentiert. Die Spotintensität ist dabei um Faktor 2.3 stärker, als die des Bereichs 241-258 und mindestens um Faktor 4 stärker als bei den übrigen Spots.

Um nun zu überprüfen, ob die Aminosäuren 233-244 von Pex13p für eine Interaktion mit Pex14p essentiell sind, wurden drei zusätzliche Pex13p-Verkürzungen erstellt (Tab. 3) und diese zusammen mit Pex14p im Two-Hybrid System analysiert.

Pex13p-Aminosäurebereich	Bezeichnung in pPC 97
173-258	pKat145
173-233	pKat143
221-310	pKat144

Tab. 3 Erstellung von Pex13p-Verkürzungskonstrukten. Sich teilweise überlappende Aminosäurebereiche von Pex13p wurden in den Two-Hybrid Vektor pPC97 (Gal4p-BD) kloniert.

Diese Konstrukte wurden zusammen mit dem Pex14p-Konstrukt in den Two-Hybrid Stamm HF7c transformiert und deren Fähigkeit mit Pex14p zu interagieren, analysiert.

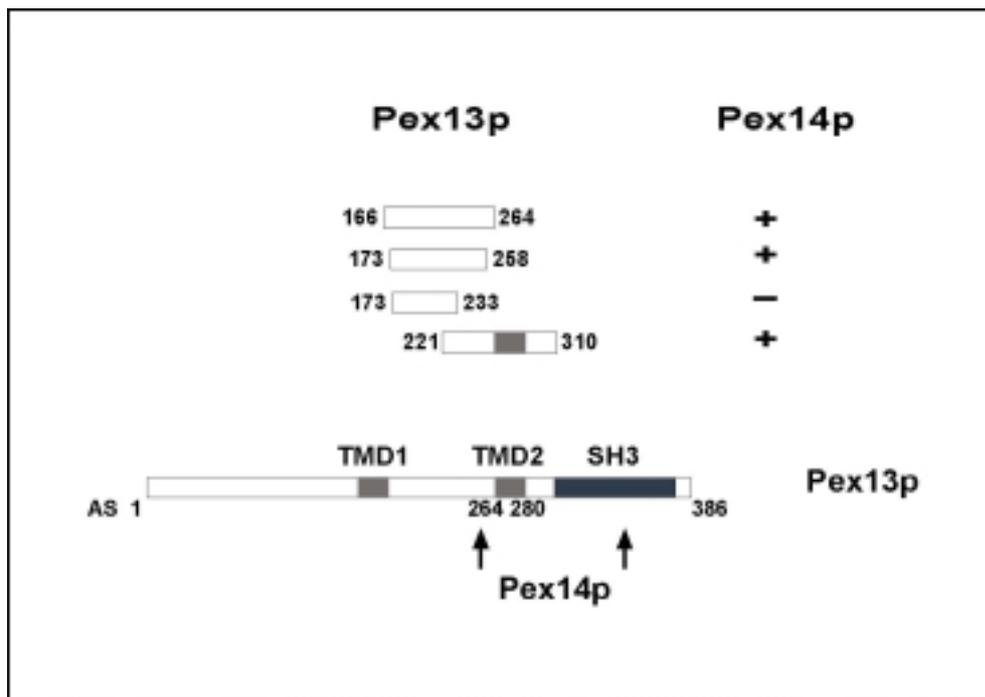


Abb. 3.35 Analyse der Interaktion zwischen Pex14p und Pex13p-Loop-Konstrukten im Hefe Two-Hybrid System. A) Die Übersicht zeigt diejenigen Konstrukte mit einem +, die noch in der Lage sind mit Pex14p zu interagieren. B) Modell der putativen Bindestellen innerhalb Pex13p für Pex14p.

Der in Abb. 3.32 für eine Bindung zwischen Pex13p und Pex14p als minimal ermittelter Bereich von Aminosäure 166 bis 264 konnte in dieser Analyse nochmals eingengt werden. Das Konstrukt Pex13p₁₇₃₋₂₅₈ interagiert mit Pex14p während Konstrukt Pex13p₁₇₃₋₂₃₃ dazu nicht mehr in der Lage war. Hierbei scheinen demnach besonders die Aminosäuren 233-258 von Bedeutung zu sein. Dies wurde auch durch ein weiteres Konstrukt Pex13p₂₂₁₋₃₁₀ verdeutlicht, welches wieder in der Lage war, mit Pex14p zu interagieren. Diese Daten waren im Einklang mit jenen des Pex13p-Peptidscans (Abb. 3.34), dort wurden die intensivsten Spots im Bereich von Aminosäure 233-244 detektiert.

3.5.3 Ermittlung des minimalen Pex13p Bindebereichs für Pex14p

Im folgenden wurde versucht über eine Längenanalyse die minimale Peptidlänge, die zur Bindung von Pex14p ausreicht, zu ermitteln. In diesem Ansatz wurde von Spot 116, der im Peptid-Scan das stärkste Signal aufwies, ausgegangen. Dieser Spot repräsentierte die 20 Aminosäuren des Aminosäurebereichs 231-250 von Pex13p. Von diesen 20 Aminosäuren erfolgte eine Längenanalyse auf einem Pex13p-Peptidscan. Hiermit wurde ermittelt, welches der verkürzten Peptide noch in der Lage war, eine Bindung mit His₆-PEX14 einzugehen.

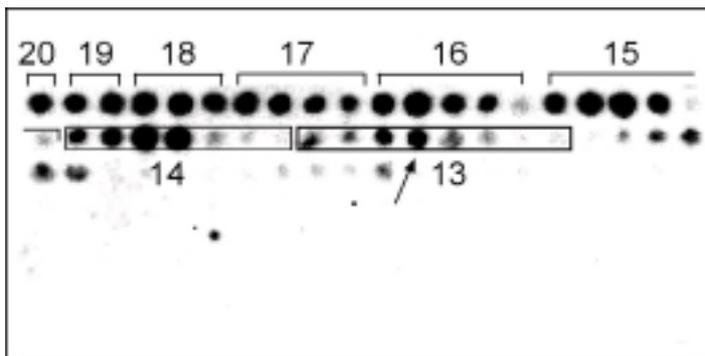


Abb. 3.36 Längenanalyse des Pex14p-bindenden Pex13p₂₃₁₋₂₅₀ Peptids. Die Längen der Peptide sind über den Klammern angegeben. Das kürzeste Peptid, welches in der Lage war, Pex14p zu binden, ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Der Pfeil zeigt auf ein 13 Aminosäuren langes Peptid von Pex13p, welches den Aminosäurebereich 234-245, repräsentiert durch die Sequenz NKLIEDFQKFNDS, darstellt. Dieses Pex13p-Peptid stellte sich als kürzestes Peptid heraus, welches noch in der Lage war, eine effiziente Bindung zu vermitteln.

3.5.4 Substitutionsanalyse des Bindebereichs von Pex13p für Pex14p

Um den Beitrag jeder Aminosäure innerhalb dieses Peptids zu ermitteln und um die Substituierbarkeit jeder Position durch andere Aminosäuren festzustellen, wurde eine Substitutionsanalyse durchgeführt. Dabei wurde jede Aminosäure-Position des Peptids durch alle 20 genetisch codierten Aminosäuren substituiert. Somit sollte nun in einer nächsten Analyse geklärt werden, welche Aminosäuren innerhalb dieses Peptids für die Interaktion mit Pex14p essentiell sind und welche davon ausgetauscht werden können.

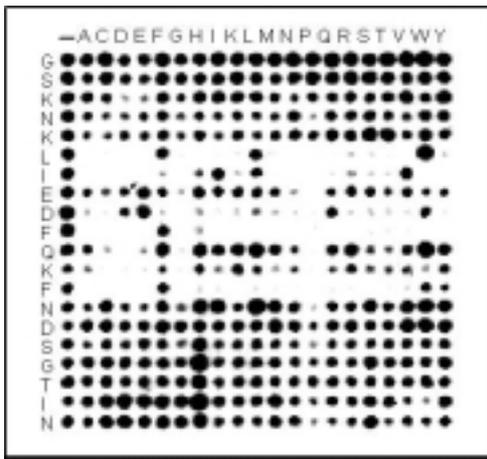


Abb. 3.37 Substitutionsanalyse des Aminosäurebereichs 231-250 von Pex13p. In diesem Peptid-Scan wurde jeweils eine Aminosäure ausgetauscht. Die erste Spalte repräsentiert unveränderte Peptide (-), die erste Zeile zeigt an, durch welche Aminosäure die jeweilige Aminosäure ausgetauscht wurde.

Die erste Spalte stellt Spots der Aminosäuren 231(G)-250(N) dar. In der zweiten Spalte fand eine Substitution der jeweiligen Aminosäure mit A (Alanin) statt. In der dritten Spalte erfolgte die Substitution mit C (Cystein), usw. Bei jenen substituierten Aminosäuren, die noch eine *in vitro* Bindung von Pex14p ermöglichen, findet sich ein Signal. Wird durch die Substitution die Bindung verhindert, so bleibt das Signal aus.

Der über die Längenverkürzung auf 13 Aminosäuren eingeeengte Bereich

NKLIEDFQKFNDS AS 234-245

konnte mittels dieser Substitutionsanalyse die für die Pex14p-Erkennung wichtigen Aminosäuren ermitteln. Es handelt sich dabei um 5 Aminosäuren, welche in der folgenden Tabelle zusammen mit den potentiellen Substituenten dargestellt sind.

LIEDFQKF (AS 236-243)		
Wildtyp-Aminosäure	Aminosäureposition	substituierbar mit:
(L) Leucin	236	(F) Phenylalanin oder (W) Tryptophan
(I) Isoleucin	237	(L) Leucin oder (V) Valin
(D) Asparaginsäure	239	(E) Glutaminsäure, (Q) Glutamin oder (W) Tryptophan
(F) Phenylalanin	240	-----
(F) Phenylalanin	243	(W) Tryptophan oder (Y) Tyrosin

Tab. 4: Übersicht der Aminosäuren, die für die Anbindung von Pex14p an Pex13p eine essentielle Rolle innehaben.

Hierbei scheinen vor allem die unpolaren Aminosäuren Leucin, Isoleucin und Phenylalanin sowie Asparaginsäure von großer Bedeutung zu sein.

Bei der Inkubation eines Pex13p-Peptidscans mit His₆-Pex7p wurde entgegen der Erwartung kein Signal innerhalb der ersten 100 Aminosäuren von Pex13p erhalten (im Vergleich siehe Abb. 3.6), sondern in dem Bereich, in dem auch die Pex14p-Anbindung stattfand (Daten nicht gezeigt). Da dieser Bereich im Two-Hybrid System nicht mit Pex7p interagiert, wurde der gleiche Pex13p-Peptid-Scan, mit einem *E. coli* Zellextrakt inkubiert, welcher lediglich den leeren His₆-Vektor exprimiert. Dieses Experiment lieferte ebenso ein deutliches Signal bei den Spots 113-117, welche den Bereich der Aminosäuren 233-244 umfassten.

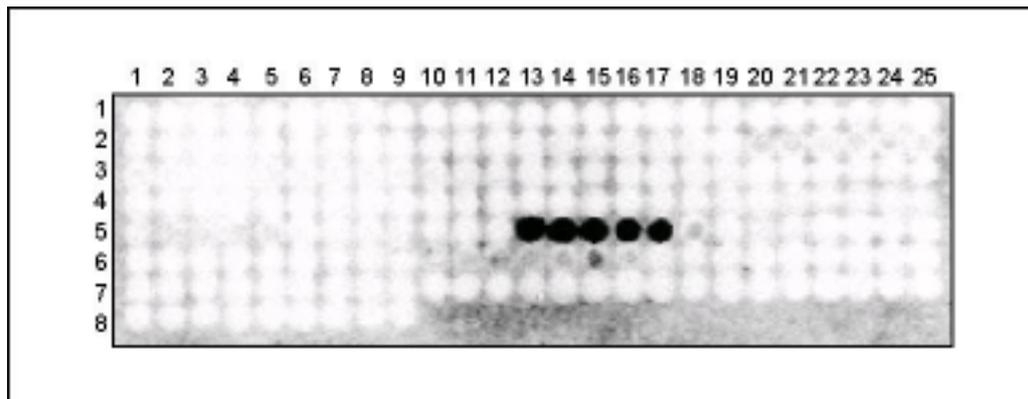


Abb. 3.38 Inkubation eines Pex13p-Peptidscans mit einem *E. coli* Extrakt, der einen His₆-Leervektor exprimiert. Als Zweitantikörper wurde ein α -HIS-Antikörper eingesetzt.

Die in diesem Scan detektierten Spots sind deckungsgleich mit einer Reihe von Spots, die bei der Inkubation des Pex13p-Peptidscans mit Pex14p erhalten worden sind. Dies würde bedeuten, dass ein bislang unbekanntes *E. coli* Protein mit solch einer starken Affinität an Pex13p zu binden vermag. Diese Bindung könnte die eigentliche Pex14p-Pex13p Bindung überlagern. Da auch im Two-Hybrid System der selbe Bereich von Pex13p für eine Interaktion mit Pex14p identifiziert wurde, könnte die beobachtete *in vitro* Bindung des putativen *E. coli* Proteins mit dem Pex13p Peptid jene von Pex14p überlagern. Um dies zu klären, sind auf alle Fälle weiterführende Arbeiten, wie zum Beispiel eine massenspektroskopische Analyse der positiven Spots notwendig.

3.6 Bindung von Pex13p an Pex19p

Bei der Topogenese peroxisomaler Membranproteine spielt Pex19p eine kritische Rolle, indem es mit einer Reihe von peroxisomalen Membranproteinen (PMP) Interaktionen eingeht (Brosius *et al.*, 2002; Fransen *et al.*, 2001; Jones *et al.*, 2001; Sacksteder *et al.*, 2000; Snyder *et al.*, 2000). Bisher gelang es jedoch nicht, eine Konsensussequenz für diese Bindung zu finden. Im Rahmen dieser vorliegenden Arbeit sollte dazu in dem integralen Membranprotein Pex13p als Vertreter eines PMP die Pex19p-Bindestelle gefunden werden, um daraufhin die Anforderungen an eine solche Sequenz zu analysieren.

3.6.1 Pex13p interagiert im Two-Hybrid System mit Pex19p

Um zu klären, ob *S. cerevisiae* Pex19p an Pex13p bindet, wurde ein Two-Hybrid Assay durchgeführt. Zuvor wurde Pex19p in beide Two-Hybrid Vektoren kloniert (pKat61 und pKat63). Dabei stellte sich jedoch heraus, dass Pex19p lediglich als Fusion mit der Aktivierungsdomäne eingesetzt werden konnte, da die Fusion mit der Bindedomäne autoaktivierend war (Daten nicht gezeigt).

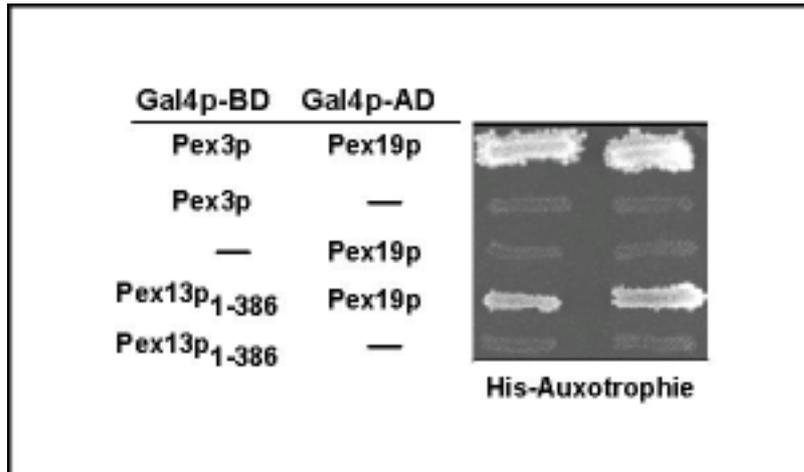


Abb. 3.39 Analyse der Interaktion zwischen Pex13p und Pex19p im Two-Hybrid System. Die Analyse erfolgte im Wildtypstamm HF7c. Doppeltransformaten mit Expression der angezeigten Fusionsproteine wurden auf SD-Agarplatten ohne Leucin und Tryptophan selektioniert und zum Nachweis einer Histidin-Prototrophie auf Platten ohne Histidin, Leucin und Tryptophan mit 5 mM 3-Aminotriazol replikaplatziert. Die Abbildung zeigt jeweils zwei unabhängige Doppeltransformaten.

In Abb. 3.39 wird deutlich, dass die beiden Proteine Pex3p und Pex19p eine sehr starke Interaktion miteinander eingehen (Götte *et al.*, 1998; Snyder *et al.*, 1999a), sie wurden in diesem Versuch als Positivkontrolle eingesetzt. Pex13₁₋₃₈₆ interagiert aber ebenso mit Pex19p, wenngleich diese Interaktion deutlich schwächer als jene mit Pex3p war. So zeigten die Pex13p/Pex19p-Transformanten erst nach ca. 7 Tagen ein Wachstum auf Histidin-Mangelmedium, wohingegen die Pex3p/Pex19p-Transformanten bereits nach 2 Tagen sichtbare Kolonien bildeten.

Um den Bindebereich innerhalb von Pex13p weiter einzuengen, wurden weitere Verkürzungskonstrukte von Pex13p erstellt und Fähigkeit mit Pex19p zu interagieren, überprüft.

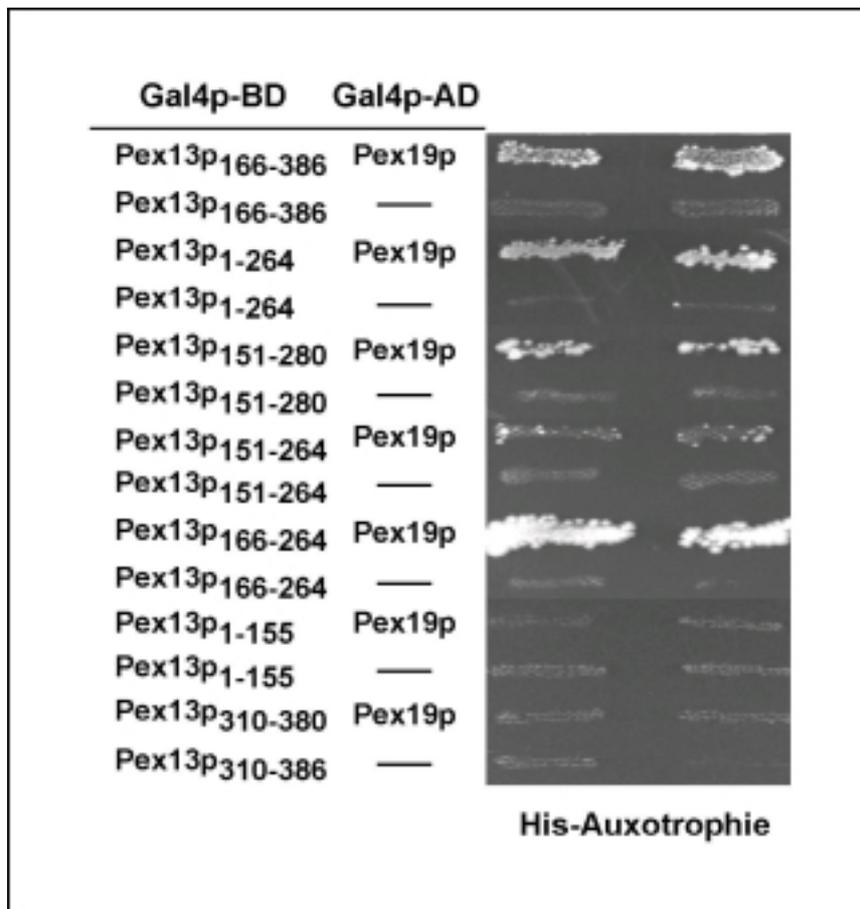


Abb. 3.40 Two-Hybrid Analyse der Interaktion zwischen den angegebenen Pex13p-Verkürzungsstrukturen und Pex19p.

In Abb. 3.40 wird deutlich, dass all jene Pex13p-Verkürzungsstrukturen in der Lage waren, eine Interaktion im Two-Hybrid System mit Pex19p einzugehen, welche den Aminosäurebereich 166-264 beinhalteten. Weder die SH3-Domäne (Aminosäure 310-386) noch der Aminoterminus (Aminosäure 1-155), der an Pex7p und Pex18p/Pex21p bindet, waren in der Lage, eine Bindung mit Pex19p einzugehen.

3.6.2 Heterologe Expression von Pex19p

Nach den Two-Hybrid Ergebnissen sollte anschließend über eine *in vitro* Bindungsstudie ein Beweis erbracht werden, dass diese Interaktion direkt abläuft. Hierzu sollte Pex19p als GST-Fusion (pKat79) in *E.coli* exprimiert und aufgereinigt werden. Als optimale Induktionsbedingungen wurde eine IPTG-Konzentration von 0,3 mM gewählt und eine Induktionsdauer von 4 Stunden ermittelt (Daten nicht gezeigt).

3.6.2.1 Gewinnung eines Pex19p spezifischen Antiserums

Um Pex19p für die Detektion im Immunoblot als Antikörper zur Verfügung zu haben, wurde zur Immunisierung eines Kaninchens (Fa. Eurogentec) die benötigte Menge an rekombinantem Protein GST-Pex19p unter nativen Bedingungen aufgearbeitet und mittels Affinitätschromatographie unter Verwendung einer GST-Sepharose-Säule aufgereinigt. Proben der einzelnen Fraktionen jedes Reinigungsschrittes wurden zur quantitativen Analyse der Isolierung in äquivalenten Volumina über eine SDS-Gelelektrophorese getrennt und nach Färbung mit Coomassie analysiert. Ein dem Fusionsprotein entsprechendes Protein mit der ungefähren Masse von 66 kDa konnte im Rahmen der Proteinaufreinigung isoliert werden. In Abb. 3.41 ist eine Übersicht der Proteinaufreinigung dargestellt. Gezeigt wird der lösliche Überstand, das nicht an die Sepharose gebundene Protein (Durchlauf) und das mit 10 mM Glutathion eluierte Protein Pex19p. Das Molekulargewicht von Pex19p entspricht ca. 40 kDa; der GST-Fusionsanteil hat eine Größe von ca. 26 kDa, als Fusionsprotein ergibt sich daraus ein Molekulargewicht von ca. 66 kDa.

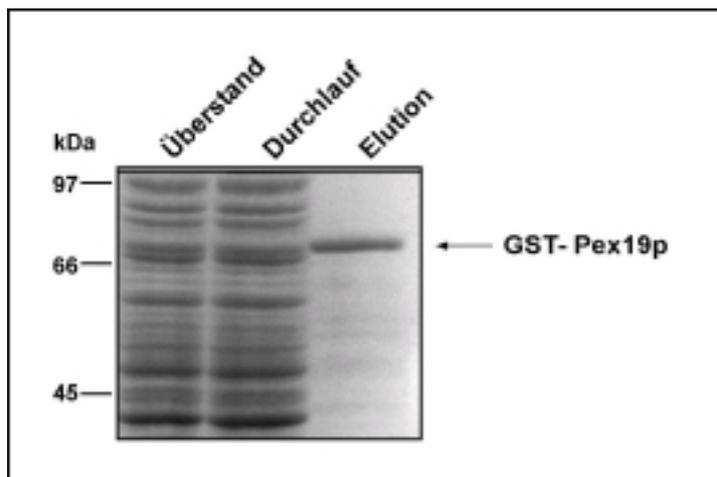


Abb. 3.41 Elution von GST-Pex19p. Entsprechende Mengen an löslichem Protein (Überstand), an nicht gebundenem Protein (Durchlauf) und an eluiertem Protein sind auf einem 12 %igen SDS-Gel dargestellt. GST-Pex19p hat ein apparentes Molekulargewicht von 66 kDa.

3.6.2.2 Detektion des Pex19p-Proteins

Das nach der Immunisierung mit dem Pex19p-Fusionsprotein gewonnene polyklonale Serum wurde auf dessen Spezifität untersucht. Hierzu wurden Gesamtzellextrakte des Wildtyp-Stammes UTL-7A sowie aus UTL-7A $pex19\Delta$ gewonnen, über SDS-PAGE aufgetrennt und nach dem Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran mit dem Antiserum inkubiert. Als Kontrolle wurde das zur Immunisierung verwendete Antigen mitaufgetragen.

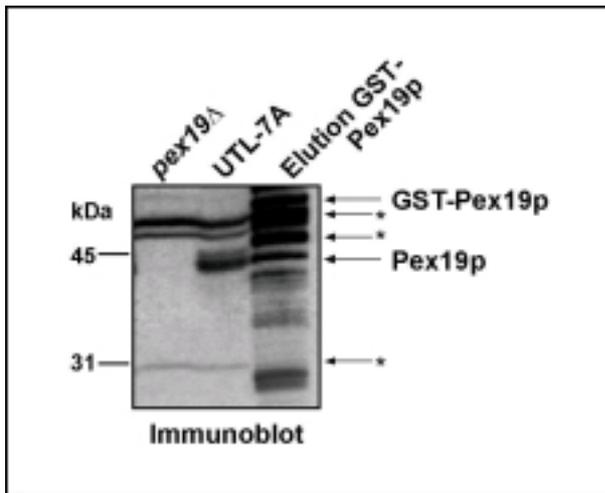


Abb. 3.42 Immunologische Detektion von Pex19p in Gesamtzell-Lysaten von UTL-7A. Von Gesamtzell-Lysaten Ölsäure-induzierter Zellen des Wildtyps und der *pex19Δ* Mutante wurden gleiche Volumenanteile (1/30 des Ansatzes) mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese getrennt und auf Nitrocellulose immobilisiert. Zusätzlich wurde 1/500 der GST-Pex19p Elution, welche zur Immunisierung eingesetzt wurde, mitaufgetragen. Die Membran wurde mit dem Antikörper gegen Pex19p inkubiert. Die Immunokomplexe wurden unter Einsatz des ECL-Detektionssystems identifiziert. Die mit einem * gekennzeichneten Banden stellen eine Kreuzreaktion des Antikörpers dar.

Es konnte gezeigt werden, dass das gewonnene Serum in den Gesamtzellextrakten des Wildtyp-Stammes deutlich ein Protein mit dem für Pex19p erwarteten Molekulargewicht von 40 kDa markiert. Hingegen erfolgte eine Detektion dieser Bande im Gesamtzellaufschluss der Mutante *pex19Δ* nicht, womit die Spezifität des Antiserums gegenüber dem Pex19-Protein gezeigt werden konnte. Das eingesetzte Antigen wurde erwartungsgemäß ebenfalls detektiert.

3.6.3 Erstellung einer Zellulose gebundenen Pex13p Peptid-Bibliothek

Nachdem in der Two-Hybrid Studie gezeigt werden konnte, dass für die Interaktion mit Pex19p der Aminosäurebereich 166-264 von Pex13p ausreicht, sollte überprüft werden, ob die Bindung zwischen Pex13p und Pex19p direkt verläuft oder ob sie von der Anwesenheit weiterer Proteine abhängig ist. Um dies zu analysieren, wurde eine an Zellulose gebundene Peptid-Bibliothek von Pex13p erstellt (siehe 3.5.2).

3.6.3.1 Pex19p bindet *in vitro* an 20er Peptide von Pex13p

Die Behandlung der Membran erfolgte wie unter 3.5.2 beschrieben. Nach dem Waschschrift mit T-TBS erfolgte eine dreistündige Inkubation bei Raumtemperatur mit aufgereinigtem

GST, um zu überprüfen, ob hierdurch unspezifische Bindungen entstehen. Nach Auswertung des Blots konnte dies jedoch ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt). Daraufhin erfolgte die Inkubation mit dem gereinigten GST-Pex19p-Fusionsprotein mit einer Konzentration von 10 µg/ml über Nacht bei 4°C. Nach mehreren Waschschrritten erfolgte anschließend die Inkubation mit dem α-GST-Antikörper für zwei Stunden bei Raumtemperatur. Es erfolgten erneut mehrere Waschschrritte, danach wurde die Membran mit dem ECL-Reagenz inkubiert. Die sich anschließende Detektion der Spots erfolgte wie unter 3.5.2 beschrieben.

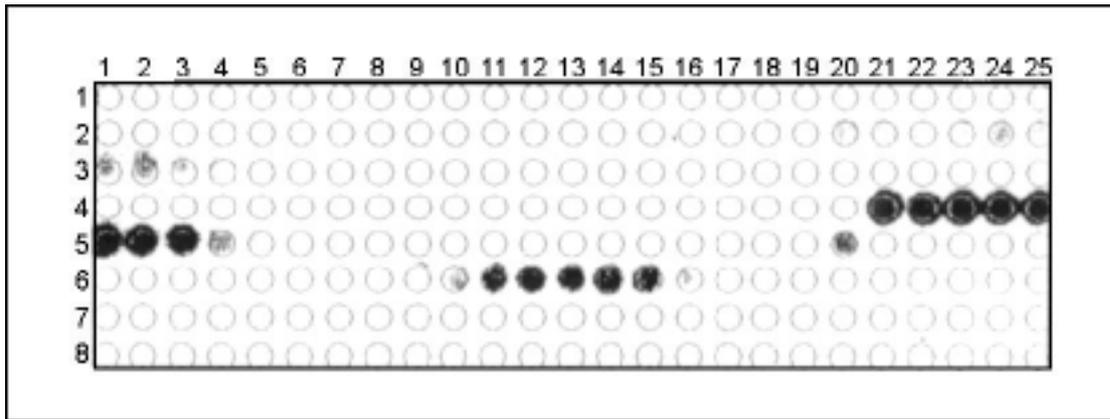


Abb. 3.43 Immunologische Detektion von GST-Pex19p welches an Pex13p-Peptide bindet. Eine Membran, die den gesamten offenen Leserahmen von Pex13p in Form von 20er Peptiden repräsentiert, wurde mit gereinigtem GST-Pex19p inkubiert. Die Detektion der Bindungsstellen erfolgte mit einem gegen GST gerichteten monoklonalen Antikörper.

Auf der Membran konnten zwei Spotsequenzen und ein deutlicher einzelner Spot identifiziert werden. Der erste Bereich fand sich von Spot 96 bis Spot 103 und stellt den überlappenden Aminosäurebereich 205-210 von Pex13p dar. Die zweite Sequenz findet sich von Spot 136 bis 140, diese Spots umfassen den überlappenden Aminosäurebereich 279-291 und der einzelne Spot bei 120 stellt den Bereich 239-259 dar.

Spot	überlappender Pex13p-Aminosäurebereich	Sequenz
96-103	205-210	KFLKKI
120	239-259	DFQKFNDSGTINSNEKATTR
136-140	279-291	LNKFITKLQTSQT

Tab. 5 GST-Pex19p bindet an verschiedene Aminosäurebereiche von Pex13p

Die Ergebnisse der Spotdetektion zeigen (Tab. 5 und Abb. 3.43), dass Pex19p an Pex13p innerhalb des Aminosäurebereichs 205-291 binden konnte. In Abb. 3.40 konnte anhand der Pex13p-Verkürzungskonstrukte als minimaler Bindebereich von Pex19p an Pex13p der

Aminosäurebereich 166-264 ausfindig gemacht werden. Dieser Bereich deckt sich mit der Analyse der Pex13p Peptid-Spots im Bereich der Aminosäuren 205-259. Der Spotbereich, der die Aminosäuren 279-291 repräsentiert, wurde in dieser ersten Two-Hybrid Studie nicht explizit analysiert. Auffällig ist bei dieser Spotsequenz, dass das durch den Zweitantikörper erhaltene Signal um einen Faktor von 8 schwächer erscheint als die erste Spotsequenz, welche die Aminosäuren 205-210 repräsentiert.

3.6.4 Pex19p bindet im Two-Hybrid System an ein 60 Aminosäuren umfassendes Fragment von Pex13p

Um die Ergebnisse der Peptidbindungen auch *in vivo* zu analysieren und damit den Bindebereich noch weiter einzuengen, wurden drei weitere Verkürzungskonstrukte für Two-Hybrid Studien erstellt. Dabei enthielt Konstrukt 1 die erste mögliche Bindestelle, Konstrukt 2 die möglichen Bindestellen 2 und 3 und Konstrukt 3 die putativen Bindestellen 1 und 2.

Aminosäurebereich von Pex13p	umfasst mögliche Bindestelle	pPC 97
173-233	1	pKat143
221-310	2+3	pKat144
173-258	1+2	pKat145

Tab. 6 Erstellung von Verkürzungskonstrukten von Pex13p. Drei sich teilweise überlappende Aminosäurebereiche von Pex13p wurde in den Two-Hybrid Vektor pPC97 kloniert.

Im Two-Hybrid Test wurde untersucht, welche dieser neu erstellten Verkürzungskonstrukte in der Lage sind, mit Pex19p zu interagieren.

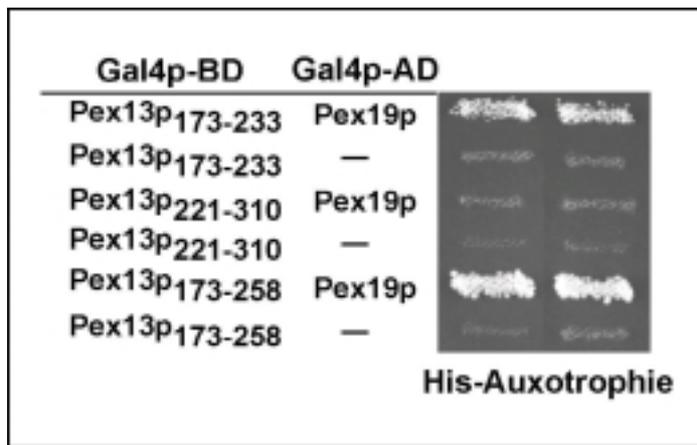


Abb. 3.44 Analyse der Interaktion zwischen dem gesamten Pex19p und den aufgrund des Peptid-Scans erstellten Pex13p Verkürzungen im Two-Hybrid System. Die Analyse erfolgte im Wildtypstamm HF7c. Doppeltransformaten mit Expression der angezeigten Fusionsproteine wurden auf SD-Agarplatten ohne Leucin und Tryptophan selektioniert und zum Nachweis einer Histidin-Prototrophie auf Platten ohne Histidin, Leucin und Tryptophan mit 5 mM 3-Aminotriazol replikatlattiert. Die Abbildung zeigt jeweils zwei unabhängige Doppeltransformaten.

Die Kotransformation von Pex13p und Pex19p führte bei Pex13p₁₇₃₋₂₃₃ und bei Pex13p₁₇₃₋₂₅₈ zur Aktivierung des Reportergens, während das Konstrukt Pex13p₂₂₁₋₃₁₀ nicht mehr in der Lage war, mit Pex19p zu interagieren. Somit konnte Bindebereich 1 (Aminosäure 205-210, Tab. 5) *in vivo* bestätigt werden, nicht jedoch Bereich 2 und 3. Letztere beiden Bereiche banden auch im *in vitro* Blot (siehe Abb. 3.43) deutlich schwächer an Pex19p und wurden deshalb als falsch positive Signale gewertet. Auffällig ist dabei, dass das 85 Aminosäure lange Konstrukt Pex13p₁₇₃₋₂₅₈ eine deutlich stärkere Interaktion mit Pex19p eingeht, als das 60 Aminosäuren umfassende Konstrukt Pex13p₁₇₃₋₂₃₃.

Die Funktionalität des Two-Hybrid Konstrukts Pex13p₂₂₁₋₃₁₀ war dabei dadurch gegeben, dass es in der Lage war, eine Interaktion mit Pex14p einzugehen (siehe Abb. 3.35).

Die folgende Übersicht fasst die Daten der Two-Hybrid Analysen zwischen Pex13p und Pex19p zusammen.

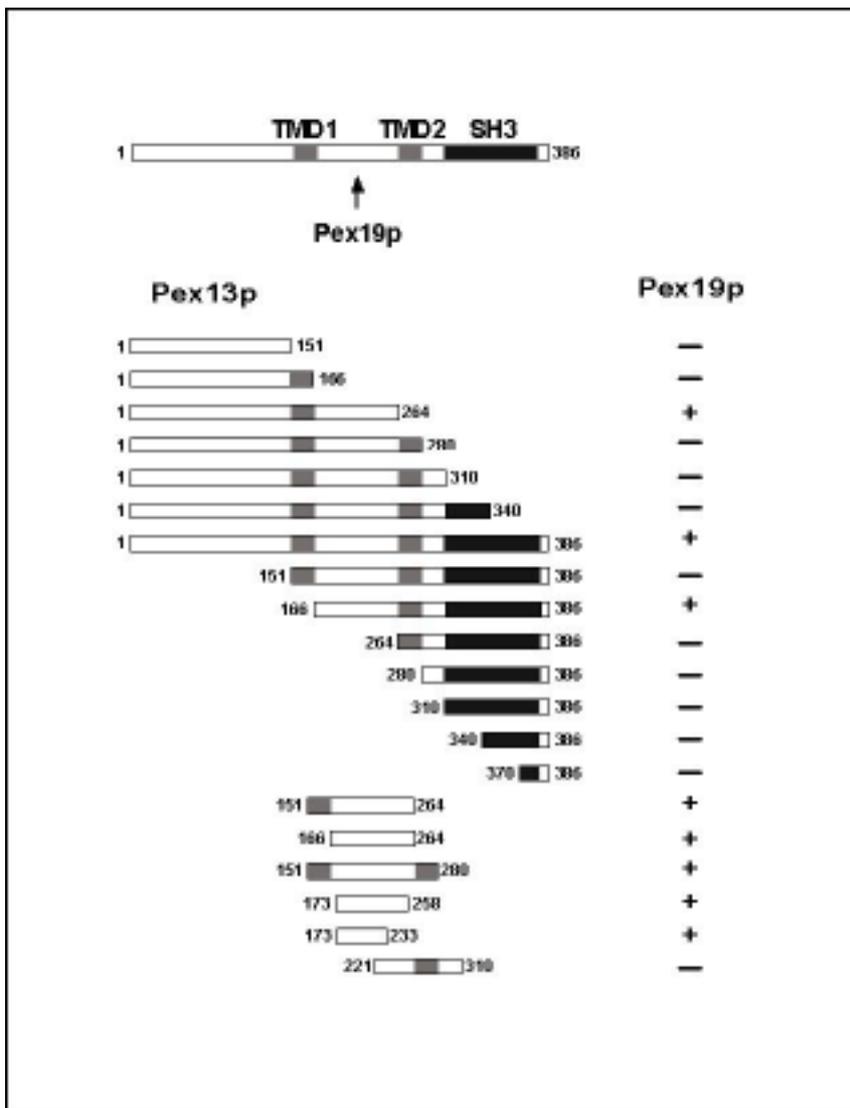


Abb. 3.45 Ergebnis der Two-Hybrid Studie zwischen Pex19p und Pex13p. + bedeutet, dass eine Interaktion bei drei unabhängigen Doppeltransformaten stattgefunden hat, bei - konnte keine Interaktion gezeigt werden.

3.6.5 *Pex19p bindet in vitro an 11 Aminosäuren von Pex13p*

Eine Möglichkeit, den Bindebereich für Pex19p in Pex13p weiter einzuengen als über die Methode des Two-Hybrid Systems, ist die Durchführung einer Längenanalyse anhand eines Peptidscans. Dazu wurde der Aminosäurebereich 199-218 von Pex13p, der dem Spot 100 entspricht, sukzessive verkürzt. Die Inkubation des Peptid-Scans mit GST-Pex19p erfolgte wie zuvor beschrieben. In der folgenden Abbildung sind diejenigen Spots markiert, an welche Pex19p noch binden konnte.

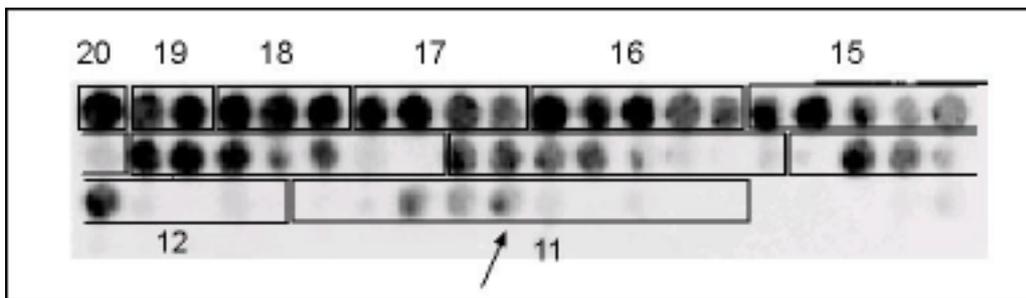


Abb. 3.46 Analyse der Längenverkürzung des Pex19p bindenden Pex13p₁₉₉₋₂₁₈-Peptids. Das kürzeste Peptid, welches noch in der Lage war, Pex19p zu binden, ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

In der Analyse der Längenverkürzung zeigten sich in der dritten Reihe drei Spots, die eine Bindung mit Pex19p eingehen können. Der Pfeil zeigt auf ein 11 Aminosäuren langes Peptid von Pex13p, welches den Aminosäurebereich 203-213 mit der Sequenz IMKFLKKILYR darstellt. Diese Verkürzung ist noch in der Lage, *in vitro* an Pex19p zu binden.

Die Art und Weise der Verkürzungen soll anhand des 11 Aminosäuren langen Peptids, welches noch mit Pex19p zu interagieren konnte, gezeigt werden.

GIFAIMKFLKKILYRATKGR	Interaktion mit Pex19p
GIFAIMKFLKK	--
IFAIMKFLKKI	--
FAIMKFLKKIL	+
AIMKFLKKILY	+
IMKFLKKILYR	++
MKFLKKILYRA	--
KFLKKILYRAT	--
FLKKILYRATK	--
LKKILYRATKG	--
KKILYRATKGR	--

Tab. 7 Übersicht der sukzessiven Verkürzungen des Spots 100. Dargestellt sind die verkürzten Peptide von Pex13p und deren Fähigkeit, eine Interaktion mit Pex19p einzugehen.

Hierbei gibt es bei dem 11 Aminosäuren langen Peptid 10 verschiedene Verkürzungsmöglichkeiten (Tab. 7), wobei 3 davon in der Lage sind, mit Pex19p zu interagieren. Nun schließt sich die Frage an, welche Aminosäuren innerhalb dieses Peptids für die Interaktion mit Pex19p essentiell sind und bei welcher Aminosäure ein Austausch stattfinden kann. Zur Analyse der Substitutionsmöglichkeit der Aminosäuren erfolgte der Austausch von je einer Aminosäure. Auf dem Blot in Abb. 3.47 stellt die erste Spalte die Spots der Aminosäuren 199(G)-218(R) dar. In der zweiten Spalte fand eine Substitution der Aminosäuren 199-218 jeweils mit A (Alanin) statt. In der dritten Spalte erfolgt die Substitution mit C (Cystein), usw.

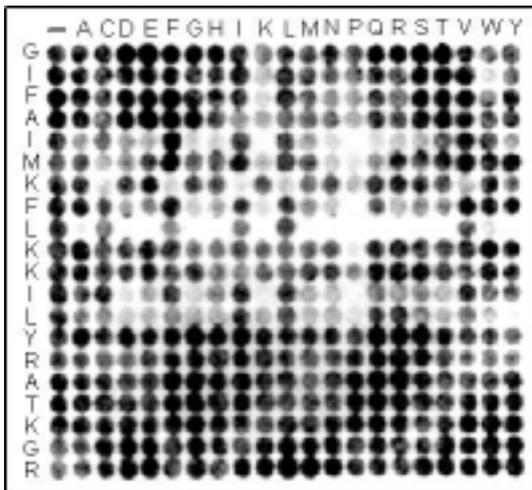


Abb. 3.47 Substitutionsanalyse der Aminosäuren 231-250 von Pex13p. In diesem Peptid-Scan wurde jeweils eine Aminosäure ausgetauscht. Die erste Spalte zeigt die Aminosäureabfolge des unveränderten Peptids an, die erste Zeile beschreibt die substituierten Aminosäuren.

Das nach Inkubation mit GST-Pex19p und anschließender immunologischen Detektion erhaltene Ergebnis ist in der folgenden Tabelle dargestellt (Tab. 8). Aus der Summe aller Substitutionsmöglichkeiten dieses Peptids konnte daraus ein Konsensus für die Pex19p-Bindestelle abgeleitet werden.

Wildtyp	Konsensus
A	X
I	CFILTVW
M	AIEFGHILMRSTUVWY
K	ADEGHKMNQRSTWY
F	ACFILQVWY
L	CILV
K	X außer P
K	X außer P
I	ACFILVWY
L	ILQRV
Y	X

Tab. 8: Substitutionsanalyse des Pex13p-Aminosäurebereichs 203-213.

Zusammenfassend mit dem Ergebnis der Two-Hybrid Analyse, bei der als minimaler Bindebereich die Aminosäuren 173-233 ermittelt wurden, ergab sich somit ein Bindebereich für Pex19p an Pex13p im Bereich der Aminosäuren 203 bis 211, wobei vermutlich eine besonders wichtige Rolle der Aminosäure Leucin in Position 207 und 211 zukommt. Dies müsste nun in weiterführenden Arbeiten durch Punktmutationen *in vivo* bestätigt werden.